



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia  
Ano 2017

Luzia  
Georgeth  
Pereira de  
Sousa

**Estratégias biomoleculares para identificação de  
diferentes espécies animais em salsichas frescas e  
conservadas**



## **DECLARAÇÃO**

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.





Universidade de Aveiro Departamento de biologia  
2017

Luzia Georgeth Pereira  
de Sousa

**Estratégias biomolecular es para identificação  
de diferentes espécies animais em salsichas  
frescas e conservadas**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em biologia molecular e celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Luís Manuel Souto Miranda, professor auxiliar convidado do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro



## Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe pelo incansável apoio e moral e por inculcar o gosto pelos estudos. Ainda estou grata por continuar a ser essa mulher maravilhosa e batalhadora, mas que acima de todas as dificuldades continua comigo em todos os momentos desta trajetória da vida, guie-me com os seus conselhos e auxilio nas minhas angustias, obrigada minha mãe amiga companheira de todos os tempos.





**O júri**  
presidente

Prof. Doutora Maria, de Lourdes Gomes Pereira  
Professor associado c/ agregação, universidade de Aveiro

Prof. Doutora Elsa Maria Carvalheiro Dias  
Técnica especialista, centro Hospitalar do Baixo Vouga, Epe

Prof. Doutor Luís Manuel Souto Miranda  
Professor auxiliar convidado, universidade de Aveiro



## agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por tudo que tem feito na minha vida; por suas promessas e suas primícias eu agradeço. A minha gratidão não tem medida porque ele é Deus e nos dá auxílio nas angústias, e nos protege de todo o mal do inimigo.

Agradeço à minha família por se fazer presente na minha vida de uma forma direta ou indireta, pelo apoio moral e conselhos durante esta trajetória.

À minha mãe e o meu irmão por se fazerem presentes mesmo quando ausentes. Estão no meu coração e na minha vida, dando um apoio moral.

Ao Evaristo Sapalo Cassinda por fazer parte da minha vida e agir como um pai e contribuindo de uma forma direta na minha formação.

À minha filha Gabriela Abrantes, Noemia Jamba; Celestino Jamba; Salome Cassinda por me darem um incentivo maior pela vida e me fazerem pensar que a vida um dia será melhor, muito obrigada.

Agradeço ao José Carlos Fernandes Zacarias pelo apoio moral incansável durante a realização deste trabalho.

À doutora Maria de Lourdes Pereira pelo incansável apoio moral aquando da realização do mesmo.

Ao meu orientador e professor Luís Souto Miranda por ter sido muito paciente e atencioso; o meu muito obrigado. À professora Helena e os meus amigos que de uma forma direta ou indireta fizeram parte da realização deste projeto. Ao André Gabriel, Elieje, Juliana Abrantes, Juliane Viegas e a Rita Pina o meu muito obrigado.



palavras-chave      Segurança alimentar; salsichas; biomarcadores; fraude alimentar; PCR em tempo real; biomoleculares.

resumo      O tema da alimentação é cada vez mais pertinente, visto que está subjacente a todas as pessoas, independentemente do país e costumes culturais. Todo o ser humano necessita de se alimentar. Como tal, a manutenção da segurança e qualidade alimentar é de grande importância na sociedade atual.

Existe uma relação íntima entre a alimentação e a saúde humana. Certos países em vias de desenvolvimento, como é o caso de Angola, passam por *deficit* alimentar e as doenças causadas devido a carência de determinados nutrientes é visível. Será de esperar que com os avanços tecnológicos se consiga fazer chegar comida com um determinado grau de qualidade ao número máximo de pessoas do mundo mas, para tal, é necessário garantir o controlo e minimizar a ocorrência de fraudes alimentares.

Têm sido verificadas ações fraudulentas na classe dos enchidos como adição de carnes que não estão devidamente mencionadas nos rótulos ou substituição da matéria prima. Este acontecimento põe em causa a segurança alimentar. Deste modo é necessário criar medidas que possam erradicar todos os casos de fraudulência identificáveis.

Utilizando uma estratégia biomolecular, é possível proceder à despistagem de carnes contaminantes em produtos cárneos processados. Em Portugal, a ASAE tem divulgado informações pertinentes ao consumidor relativas à autenticidade, rotulagem e rastreabilidade do produto e isto tem permitido um fácil acesso do cliente aos resultados laboratoriais que confirmam ou não casos fraudulentos. Subentende-se a relevância que a PCR em tempo real com recurso a *primers* específicos tem tido em análises deste cariz.

Este trabalho tem como objetivo descrever alguns métodos de análise molecular que são utilizados corriqueiramente em determinadas associações como a ASAE e enunciar e discutir sobre um estudo feito entre 2015 e junho de 2017 pela ControlVet, uma empresa privada que tem participado vigorosamente na identificação de fraudes recorrendo á PCR em tempo real.

Hoje, o consumidor interessa-se pela natureza do produto que consome. A luta contra a falsificação alimentar só pode ser eficaz quando todos velarem pela qualidade do alimento que está disponível no mercado, de modo a que não haja riscos na saúde pública e de modo a que o preço do produto corresponda a essa qualidade.



keywords Food safety; sausages; biomarkers; food fraud; biomolecular techniques; PCR.

abstract The issue of food is increasingly relevant as it underlies all people regardless of country and cultural customs. Every human being needs food. As such, maintaining food safety and quality is of great importance in today's society.

There is an intimate relationship between food and human health. Some developing countries, such as Angola, are suffering from food shortages and diseases caused by a lack of certain nutrients. It is expected that with the evolution of technological advance, it will be possible to get food of a certain quality to the maximum number of people in the world, but it is necessary to guarantee control and minimize the occurrence of food fraud.

In the last few years, fraudulent actions have been verified in food like sausages, such as adding meats that are not properly mentioned on the labels or substitution of the raw material. These sort of events make us ask if the food control is being maintained. Therefore, it is necessary to create measures that can eradicate all identifiable fraudulent cases.

By using biomolecular strategies, it is possible to identify contaminated meat in processed meat products. In Portugal, ASAE has divulged pertinent information to the consumer regarding the authenticity, labeling and traceability of the product and this has allowed an easy access of the client to lab results that confirm or not fraudulent cases. It is clear that real-time PCR using specific primers has a large relevance in all this.

This paper aims to describe some methods of molecular analysis that are used routinely in certain associations such as ASAE and to state and discuss a study done between 2015 and June 2017 by ControlVet, a private company that has participated vigorously in the identification of frauds using real-time PCR as methodology.

Today, consumers are interested in the nature of the product they consume. The fight against food counterfeiting can only be effective when everyone is vigilant about the quality of the food that is available on the market in order to minimize the risk to public health and to assure that the price of the product corresponds to its quality.





# Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Segurança alimentar e nutricional .....	1
1.1.1. Tipos de fraude alimentar.....	4
1.1.2. A segurança alimentar e nutricional nos países de língua portuguesa (CPLP).....	6
1.1.3. Contextualização da segurança alimentar em Angola.....	8
1.1.4. Principais causas da insegurança alimentar e nutricional em Angola.....	9
1.1.5. Perfil do Consumo Alimentar e Análise Nutricional Angolana.....	11
1.1.6. Segurança alimentar e o consumo alimentar em produtos cárneos em Angola: o caso da salsicha .....	13
1.1.7. A salsicha: Autenticidade e Rastreabilidade Rotulagem das salsichas em Portugal.....	14
1.2. Detecção de fraude alimentar em Portugal .....	17
1.2.1. Estrutura, organização e funcionamento da ASAE.....	18
1.2.2. Casos de escândalos de fraude em produtos cárneos .....	21
1.3. Métodos para a identificação de espécies contaminantes em produtos cárneos (salsichas).....	22
1.3.1. Amostras .....	23
1.3.2. Método baseado na análise de DNA .....	23
1.3.2.1. Extração de DNA.....	25
1.3.2.2. Avaliação e quantificação do DNA.....	26
1.3.2.3. A técnica de PCR .....	26
1.3.2.4. Multiplex PCR .....	30
1.3.2.5. PCR em tempo real .....	31
2. Objetivos .....	36
3. Análise do índice do consumo de salsichas em Angola.....	37
4. Discussão dos Resultados obtidos pela ControlVet .....	42
4.1. Caracterização das amostras e do processo experimental:.....	44
4.1.1. Extração de DNA: .....	44
4.1.2. PCR em tempo real .....	45
4.2. Resultados obtidos pela ControlVet e discussão .....	45
5. Conclusão .....	49
6. Referências Bibliográficas .....	51
Anexo-1: Inquérito.....	55
Anexo-2: Ficha de Estágio.....	58
Anexo-3: Protocolo de Estágio.....	59



## Índice de Figuras:

Figura 1: Detecção de fraude por diferentes tipos de amostragem no ano de 2015 pela Food Fraud Network (Initiative 2017).....	3
Figura 2: Fraude por alteração, adulteração e falsificação em produtos cárneos como os embutidos e salsichas. ....	5
Figura 3: Densidade demográfica nas diferentes províncias de Angola: Luanda, Benguela, Huambo e Huila têm o maior número de habitantes e são as cidades que mais importam produtos alimentícios (ENSAN 2009).....	12
Figura 4: Fluxograma demonstrando o processamento das salsichas. ....	15
Figura 5: Amostras analisadas no LM (ASAE) por tipo de produto em 2016. ....	20
Figura 7: Representação esquemática das etapas da amplificação da PCR (Adaptado de Vierstraete, 1999). ....	28
Figura 8: Representação da amplificação das cadeias de DNA na técnica de PCR. Para ter uma quantidade suficiente da sequência alvo são necessários cerca de 35 ciclos. Ocorre um aumento exponencial na quantidade de moléculas do DNA amplificado (adaptado de Vierstraete, 1999). ....	29
Figura 9: Descrição do método quantitativo da PCR em Tempo real para estimar a adulteração de carnes processadas com carne de cavalo. Foi utilizado o corante EvaGreen (Meira et al., 2017a). ....	33
Figura 10: Elementos que constituem a amostra inquirida em Angola na cidade de Luanda (município de Luanda).....	38
Figura 11: Resposta dos inquiridos à questão “Consome salsichas processadas?”.....	38
Figura 12: Marcas de produtos cárneos processados mais adquiridos. ....	39
Figura 13: Marcas selecionadas com base no questionário utilizado para o estudo de análise do consumo de salsichas.....	40
Figura 14: Principais superfícies comerciais onde os inquiridos preferem proceder à aquisição de salsichas. ....	41



## Índice de Tabelas:

Tabela 1: Diferentes tipo de fraude em alimentos:.....	4
Tabela 2: Indicadores de desnutrição nos países da CPLP no ano de 2013.....	7
Tabela 3: Dimensões fundamentais da segurança alimentar e nutricional:.....	9
Tabela 4: Descrição as causas de insegurança alimentar em Angola.....	10
Tabela 5: Descrição dos alimentos com base nos grupos populacionais :.....	11
Tabela 6: Resumo da literatura que se baseou na análise de DNA para a identificação da espécie (Equus caballus) apos o escândalo internacional em 2013:.....	24
Tabela 7: Exemplos de diferentes métodos de extração do DNA utilizados em produtos cárneos (Burhanettin yalçinkaya, 2016).....	25
Tabela 8: Componentes constituintes da reação de PCR em tempo real com SsoFast™ Eva Green® supermix.....	31
Tabela 9: Condições de aplicação para o SsoFast EvaGreen® Supermix:.....	31
Tabela 10: Ensaio em que se utilizou da tecnica de PCR em produtos cárneos processados: .....	34
Tabela 11: Kits de extração de DNA utilizados pela controlvert.....	44
Tabela 12: Dados reportados baseando-se na análise de DNA para a deteção de espécies bovina (Bos Taurus) nas salsichas:.....	46
Tabela 13: Dados reportados baseando-se na análise de DNA para a deteção de espécies cavalo (Equus cabullus) nas salsichas:.....	46
Tabela 14:Dados reportados baseando-se na análise de DNA para a deteção de espécies de suíno (Sus scrofa) nas salsichas de porco:.....	47
Tabela 15: Dados reportados baseando-se na análise de DNA para a deteção de espécie de galinha (Gallus galus) nas salsichas de ave.....	47



## **Abreviaturas:**

AECI – apoio financeiro espanhol de cooperação internacional

ALS – Laboratory Group

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ATP – Adenosina trifosfatada

CPLP – Comunidade dos países de língua portuguesa

CTAB – Brometo de Cetrimonium

CYTB – Citocromo b

DGFCQA – Direção Geral Fiscalização e Controlo da Qualidade Alimentar

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTPs - Desoxirribonucleótidos trifosfatados

ELISA – *Enzyme LinKed Immunosorbent Assay*

ENSAN - Estratégia Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional

FAO – *Food and agriculture organization of the United nations*

H<sub>2</sub>O – Água

HCl – Ácido clorídrico

LBPV - Laboratório de bebida e produtos vitícolas da ASAE

IDH- índice do desenvolvimento Humano

LFQ - Laboratório de físico química da ASAE

LM – Laboratório de Microbiologia da ASAE

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

MINIAGRO – ministério da agricultura/Angola

mL – Mililitro

mM – Milimolar

NaCl – cloreto de sódio

ONU – Organização das Nações Unidas

PNCA – Plano nacional de colheita de amostras

PASAN – Plano de ação de segurança alimentar e nutricional

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RNA - Ácido ribonucleico

RNase – Ribonuclease

SAN – Segurança alimentar e nutricional

SYBR Green- Corante de cianina assimétrico

$\beta$ -actin - gene humano da  $\beta$ -actina

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{M}$  – Micromolar





# **1. Introdução**

## **1.1. Segurança alimentar e nutricional**

A segurança alimentar e nutricional tem como objetivo principal garantir condições de acesso a alimentos básicos de qualidade e em quantidade suficiente, tendo em conta os valores e os hábitos alimentares impostos.

À sustentabilidade ecológica, social e económica do sistema alimentar, também foi incorporada a ideia de segurança alimentar (segurança alimentar e nutricional, 2009). A alimentação apropriada é um direito fundamental para o ser humano, estando esta inerente à dignidade humana garantida pela legislação. O poder público deve adotar medidas para garantir que os alimentos cheguem até ao prato do consumidor da forma mais segura. É assim imperativo garantir normas de segurança a fim de abonar credibilidade no consumidor.

A indústria dos alimentos processados deve cumprir as boas práticas de transformação e manipulação dos alimentos estabelecidas pela lei em vigor, tendo como objetivo promover a qualidade biológica, sanitária, nutricional e tecnológica dos alimentos (segurança alimentar e nutricional, 2009).

Por outro lado, existem algumas factores que nos levam a analisar algumas mudanças nos hábitos alimentares que levaram ao aumento do consumo de alimentos processados. Com base nas evidências do dia-a-dia há existência de pessoas subalimentadas no mundo (Estado Alimentar 2014), os hábitos alimentares mais saudáveis estão a perder-se de forma abrupta e assim tem havido uma maior procura por alimentos processados. Estão envolvidas ainda as questões de valores culturais e crenças religiosas que de certa forma nos levam a conhecer, perceber a diversidade social. Além disso, hoje a mulher tem estatuto no mercado de trabalho e a disponibilidade para dedicar-se à família tem reduzido

bastante, implicando numa redução significativa das refeições em família e, consequentemente, os bons hábitos alimentares têm vindo a diminuir (Parlamento Europeu; Conselho da União Europeia 2011). A tendência para tomar as refeições fora de casa pode ter como consequência um aumento no consumo de sódio e lípidos saturados, podendo levar a graves doenças, como a hipertensão arterial e doenças cardíacas.

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) realizou um estudo concernente à insegurança alimentar no mundo no ano de 2014 citando que a fome no mundo reduziu, mas que ainda existe mais de 805 milhões de pessoas subalimentadas, realçando a importância da segurança alimentar e nutricional como meio que permitirá erradicar a fome, principalmente em países em desenvolvimento (Estado Alimentar 2014). E para que haja segurança alimentar e nutricional adequada que garanta as devidas condições nutricionais do ser humano, há a necessidade de que o alimento esteja em devidas condições de armazenamento e conservação, além de devidamente validado e rotulado de acordo com a lei vigente. Deste modo, para que os alimentos cheguem em perfeitas condições ao consumidor os fabricantes precisam cumprir com algumas normas estabelecidas pela FAO que tem três objetivos principais: erradicar a fome, combater a insegurança alimentar e eliminar a desnutrição.

Em suma, a segurança alimentar e nutricional parte de um princípio de coordenação e organizacional das políticas estabelecidas de diferentes países relacionados com a implementação de políticas alimentares e nutricionais pelos conselhos nacionais de alimentação a nível mundial.

Recentemente, no Brasil, realizou-se um estudo de caso de deteção de comercialização de fraude em carnes e derivados contaminados por salmonela, entre outros. Registou-se ainda fraude de carne de cavalo como carne bovina, como farinha biológica, entre outros

(Vieira, A. 2017) A figura 1 ilustra a detecção por diferentes tipos de amostragem no ano de 2015 pela *Food Fraud Network*.

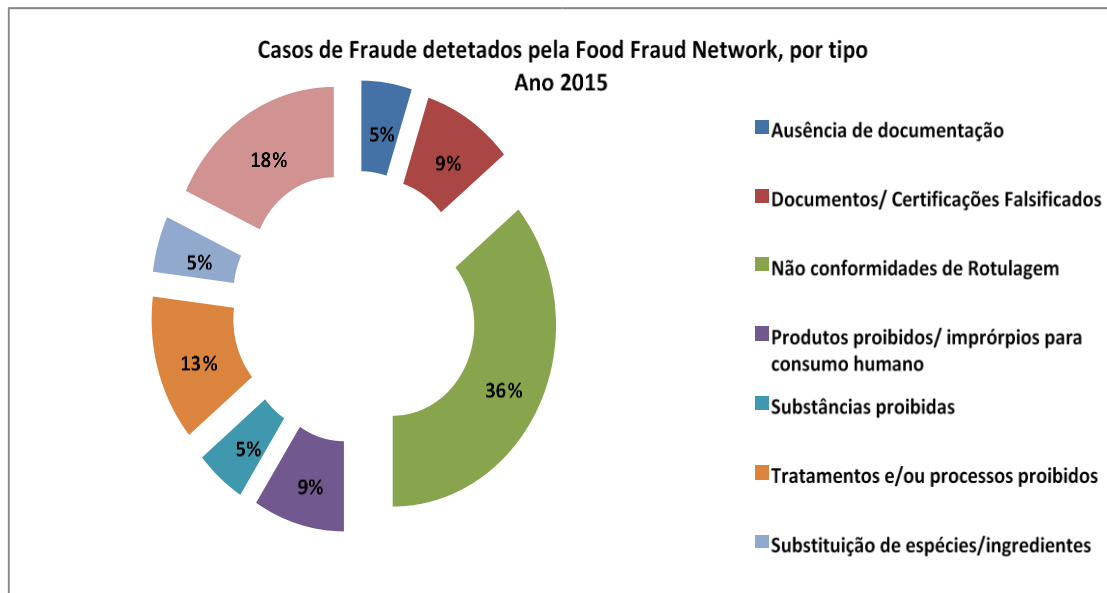


Figura 1: Detecção de fraude por diferentes tipos de amostragem no ano de 2015 pela Food Fraud Network (Initiative 2017).

Por outro lado, segundo Vieira (2017), para que ocorra fraude em alimentos, existem fatores adjuvantes que influenciam para a prática da mesma. Pondera-se o potencial à ocorrência de fraudes é elevada quando os riscos de detecção da infração e as respetivas sanções são reduzidas, quando ocorre uma globalização da cadeia alimentar e o aperto económico são elevadas e quando a cadeia de abastecimento são mais extensas e complexas (Vieira. A, 2017).

De acordo com os objetivos dos estudos feitos a nível internacional, a comissão europeia comunicou um novo regulamento que visa reforçar o controlo da cadeia agroalimentar com o intuito de haver maior transparência no combate a fraude.

### 1.1.1. Tipos de fraude alimentar

A fraude em alimentos concerne de inúmeras causas em diferentes apreciações, isso traduz que tanto nas de maior relevância como nas de menor relevância na identificação, conhecer os diferentes tipos de fraude nos leva a proporcionar maior aptidão na sua identificação e deteção nos alimentos. A tabela 1 descreve os diferentes tipos de fraude de acordo com a descrição da fraude, caracterização das causas e os possíveis alimentos fraudulentos, conforme proposto por ENVAGEISTA, 1989 (Reissig, 2009).

**Tabela 1:** Diferentes tipos de fraude em alimentos:

fraudulentos, conforme proposto por ENVAGEISTA, 1989 (Reissig, 2009).

**Tabela 2:** diferentes tipos de fraude em alimentos:

Designação		Caracterização	Exemplo em alimento
<b>Fraude por alteração</b> parcial ou total do produto (Evangelista, 1984)		Ocorre pela ação de agentes químicos, físicos, microbianos e enzimáticos. (Kolichesk, 1994).	Ovos podres, queijo passado, leite acidificado (Evangelista, 1984)
<b>Fraude por adulteração</b> na qual o p é privado em forma parcial ou total de seus Elementos característicos	Por adição ao produto ou substancia inferior	Quando autorizado por lei a adição de produtos inferiores apresenta um aspeto diferente	Farinha de milho, de mandioca e de soja em farinha de trigo
	Por adição de elementos não permitidos ou adição de substancia não revelada	Adição em produtos alimentícios de aditivos quando autorizados em quantidade alem do limite	Amido Anilina Nitrosina Cloreto de cálcio
	Por subtração de constituinte dos alimentos.	Substrações industriais de subprodutos alimentícios que são obtidos pelo mesmo meto do mas sem a intenção de lucro ilícito	Café (extração da cafeina) Farinha de mandioca Leite Trigo
	Por subtração e adição de constituinte simultaneamente	O constituinte subtraído é trocado por outro de qualidade inferior e de menor preço	Azeite de oliva Bombons Produtos com recheio Leite
	Por substituição no produto, de um ou mas de seus constituintes.	Carne geralmente moída Pode ocorrer substituição e transmitem a mesma caracter do original ocorrendo perda significativa do nutriente	Embutidos Massa de bolo de macarrão
	Por substituição de matéria-prima anunciada na embalagem, por outra parecida, porem de menos valor.	Muito utilizados em produtos industrializados	Glicose por mel Amido por gelatina Filetes de cação por peixe fino (corte enviesado)

<b>Fraude por falsificação</b> consiste em enganar o consumidor, induzindo-o a adquirir o alimento de nível inferior, julgando-o de categoria superior.	Quanto à qualidade relaciona-se com a categoria do produto.	Corte de segunda ou terceira vendida como de primeira.	Carne Fruta Peixe laranja
	Quanto ao peso ocorre no momento da comercialização	É feito durante a manobra de pesagem	Carne com maior volume de sal e elevado teor de unidade molhada
	Quanto à apresentação	Procura confundir o consumidor com novos produtos apresentados na embalagem.	Forma Cor Símbolos Dizeres
	Quanto à procedência saber qual é a preferência do produto em determinada região.	Usufrui dessa qualidade mesmo sabendo que o produto não é originário do local designado	Bebida Café Chá Queijo

Fonte: Evangelista, 1989 e Reissig 2009.

A fraude alimentar é qualquer prática em que se adiciona ou subtrai ingredientes ou químicos de dado produto alimentar, fazendo aumentar o lucro da empresa produtora. Segundo Reissig (2009), a fraude pode consistir em enganar o consumidor fazendo-se proceder de diferentes maneiras como mostra a figura 2, que descreve a procedência da fraude por alteração, adulteração e a falsificação no caso em produtos cárneos como os embutidos e salsichas. No processo de rotulagem ou embalagem dos produtos alimentares, podem ser alteradas as descrições das substâncias adicionais durante o período transformação (Reissig, 2009).



Figura 2: Fraude por alteração, adulteração e falsificação em produtos cárneos como os embutidos e salsichas.

### **1.1.2. A segurança alimentar e nutricional nos países de língua portuguesa (CPLP)**

Em 2012, foi criada uma oficina de segurança alimentar e nutricional na CPLP que se destacou em vários aspetos ligados à segurança alimentar (Lima *et al.*, 2012). A malnutrição nos países da CPLP foi alvo de atenção devido à disparidade relativa ao desenvolvimento humano. De acordo com os estudos feitos, verifica-se que o Brasil e Portugal apresentam maior desenvolvimento em relação aos países como Angola, Cabo Verde, Guiné-Bissau, Moçambique, Timor leste e São Tomé e Príncipe, sendo estes considerados países de baixa Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), em que as condições socioeconómicas são bastante desequilibradas tanto ao nível da saúde como ao nível da alimentação (Marques *et al.*, 2012). A desnutrição foi um dos pontos mais criticados em 2013, pela FAO, pelo elevado número de pessoas que apresentam malnutrição tanto acima do peso como abaixo do peso. A FAO recorre-se de dados antropométricos de modo a avaliar as condições nutricionais, tais como peso, comprimento e estatura (Marques *et al.*, 2012).

A tabela 2 demonstra o estado de desnutrição nos países da CPLP, referindo-se a uma análise de evolução da malnutrição nesses países.

Os Indicadores de desnutrição nos países da CPLP no ano de 2013 relatam que Brasil, Portugal, São Tomé e Príncipe, Cabo-Verde e Guiné-Bissau tiveram uma redução no número de população apresentada com desnutrição, comparando com Angola, Moçambique e Timor-Leste em 2010 a 2012; houve um aumento significativo nessas populações. Entre 2007 e 2011, a desnutrição crónica foi muito acentuada em vários países da CPLP em crianças menores de 5 anos. A fome nos países da CPLP continua a ser um problema hodierno e como tal, também nos países africanos (Marques *et al.*, 2012).

**Tabela 3:** Indicadores de desnutrição nos países da CPLP no ano de 2013.

	(%) População*	(%) Crianças <5 anos**			
	(2010- 2012)	(2007-2011)			
Países	Desnutrição	Baixo peso à nascença	Baixo peso	Desnutrição crónica	Desnutrição aguda
Angola	27,4	12	16	29	8
Brasil	6,9	8	2	7	2
Cabo-verde	8,9	6	-	-	-
Guiné-Bissau	8,7	11	18	32	6
Moçambique	39,2	16	15	43	6
Portugal	< 5	8	-	-	-
São Tome e Príncipe	7,7	8	13	29	11
Timor-Leste	38,2	12	45	58	19

\*Fonte: <http://www.fao.org/docrep/018/i3107e/i3107e.PDF>; (ver com, mas detalhe a construção do indicador

\*\*Fonte: <http://www.unicef.org/sowc2013/>; (detalhe da desnutrição moderada e grave)

De acordo com os detalhes descritos acerca da desnutrição que afeta os países da CPLP, é importante enfatizar a contextualização africana no ponto de vista socioeconómico, neste caso Angola que de alguma forma é considerado um país com uma riqueza esplendida e por outro lado apresenta uma pobreza extrema, onde não se justifica a incapacidade de permanecer numa instabilidade económico-financeira acentuada.



### **1.1.3. Contextualização da segurança alimentar em Angola**

A situação económica e social em Angola indica que hoje é sustentada pela extração de petróleo bem como algumas atividades organizacionais que têm vindo a ajudar a manter a economia do país. Segundo alguns estudos como base em relatórios de desenvolvimento humano (PNUD, 2006) suscita que uma boa parte da população angolana vive abaixo dos limites de pobreza e a esperança em meia de vida não ultrapassa os 41 anos. Isto significa que atualmente o índice de desemprego tem aumentando, afetando uma boa parte da população angolana levando a vários indicadores baixos como a educação, saúde, tendo como consequência a insegurança alimentar ( Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento 2014).

No que diz respeito ao conceito de segurança alimentar e nutricional em Angola, pode ser entendido como uma estratégia para definir a alimentação como uma componente primordial para a vida humana, reconhecendo que no comentário geral nº12 do comité do direito económico-social e cultural da ONU em 1999 suscita que o direito a alimentação adequada é quando cada individuo tem condições socioeconómicas adequadas para a obtenção da alimentação saudável (Parlamento Europeu; Conselho da União Europeia, 2011). Deste modo, se houver uma evolução dos principais sectores dos países como a saúde e a educação, promovendo maior controlo de qualidade nos alimentos, a educação será influenciada na formação de quadros qualificados capazes de contribuir para a estabilidade socioeconómica, principalmente nas comunidades com maior índice de pobreza. De acordo com as declarações prestadas ao definir a segurança alimentar, existem varias dimensões que precisam de trabalhar em conjunto a fim de garantir a segurança alimentar e nutricional em Angola. A tabela 3 mostra alguns pontos estratégicos em que foram adotadas decisões prioritárias apresentando as seguintes dimensões definidas: a disponibilidade de alimentos nas populações, o fácil acesso aos

alimentos, o consumo e a utilização dos alimentos adequados e a estabilidade desses produtos (Marcelino. H, 2012).

**Tabela 4:** Dimensões fundamentais da segurança alimentar e nutricional:

Distribuição	Descrição
Disponibilidade dos alimentos	A disponibilidade dos alimentos é aprovada quando os produtos internos dos diferentes sectores (agricultura, pesca pecuária, importação) asseguram que a quantidade e qualidade sanitária, nutricional e biológica vai regular o abastecimento no mercado.
Acesso aos alimentos	A capacidade que cada individuo tem para adquirir alimentos de qualidade nutricional a um custo adequado. Nesta ordem os alimentos podem ser de ordem física quando o individuo tem o acesso ao meio agrícola terra fértil, água etc. e de ordem económica que se descreve quando um individuo tem capacidades económicas para sustentar as necessidades.
Consumo e utilização dos alimentos	Refere-se ao ato de comer para além de suprir as necessidades do individuo, cumprir um papel importante na seleção dos alimentos apropriados para cada individuo e dependendo das preferências como vegetariano, macrobióticas e os frutaria ismos que carecem de uma dieta equilibrada.
Estabilidade	Refere-se à existência de silos ou armazéns onde haja disponibilidade dos alimentos num período de insegurança alimentar onde a diversificação económica é baixa em zonas de produção.

**Fonte:**(gsa.@miniagro.gov.ao Minader, 2004.(Marcelino 2012) Programa de Extensão e Desenvolvimento Rural) Angola (2009)

Estratégia Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Luanda. Ministério da Agricultura (MINADER), 2004. Programa de Extensão e Desenvolvimento Rural.

Dentro dessas dimensões descritas existem fatores que podem influenciar no desempenho e no desenvolvimento do país e consequentemente podem levar à insegurança alimentar e nutricional dentro de uma população se não forem respeitadas.

#### 1.1.4. Principais causas da insegurança alimentar e nutricional em Angola

A segurança alimentar parte do princípio que existem fatores interligados que variam em função do espaço geográfico, social e temporal. Em Angola com o fim do conflito armado, o país levou algum tempo na recuperação das zonas de conflito que foram prejudicadas pela guerra, zonas estas que se destinavam ao cultivo, deste modo pode-se assim dizer que a guerra foi um fator-chave para a insegurança alimentar em Angola havendo causas diretas e indiretas, contribuindo para a insegurança alimentar. A tabela 4

descreve a divisão das causas de insegurança alimentar que levam à instabilidade socioeconómica de Angola e que o país enfrenta não só no conflito armado mas também a produção agropecuária, o baixo nível de rendimento das famílias, destruição da infra estruturas sociais e de apoio à produção agrícola nas populações, à baixa acessibilidade e limitado poder de compra de alimentos ao nível dos agregados familiares, os desastre naturais, praticas incorretas relacionadas com os cuidados nos alimentos, o fraco conhecimento dos valores nutricionais nos alimentos, a baixa disponibilidade de estruturas de saúde, o difícil acesso aos serviços de saúde e a insuficiência de sementes e material de programação.

**Tabela 5:** Descrição as causas de insegurança alimentar em Angola:

<b>Causas diretas</b>	<b>Causas indiretas</b>
O conflito armado que o país viveu ao longo de décadas	Difícil acesso as áreas de produção agrícolas devido a presença das minas
Produção agropecuária insuficiente	Baixo índice de escolaridade principalmente nas zonas rurais
Baixo nível de rendimentos das famílias	Desestruturação familiar por diversos fatores
Destruição da infiras estruturas sociais e de apoio a produção agrícola	Vias secundárias e terciárias inacessíveis nas áreas de produção agrícola.
Baixa acessibilidade e limitado poder de compra de alimentos ao nível dos agregados familiares	Alto custo de transporte para o escoamento dos ascendentes comercializáveis
Desastres naturais (seca e cheias)	Inadequada cobertura de vacinas
Prática incorreta relacionada com os cuidados alimentares e fraco conhecimento dos valores nutricionais nos alimentos	Elevada faixa de mortalidade materno infantil
Baixa disponibilidade de estruturas de saúde e difícil acesso aos serviços de saúde	Elevado nível de mal nutrição
Insuficiência de sementes e material de programação	Deficiente acesso a água potável e ao saneamento básico.

**Fonte:** (gsa.@miniagro.gov.ao) 29-01-2009/13:03:16/ensan\_ana.doc/PPG

Nas causas indiretas de insegurança alimentar, o difícil acesso às áreas de produção agrícola devido a presença das minas, o baixo índice de escolaridade principalmente nas zonas rurais, desestruturação familiar por diversos fatores, as vias secundárias e terciárias inacessíveis nas áreas de produção agrícola, o alto custo de transporte para o escoamento

dos ascendentes comercializáveis, as coberturas de vacinas inadequadas, a elevada taxa de mortalidade materno-infantil, o elevado nível de desnutrição e o défice de água potável e saneamento do meio traduzem-se naquilo que podemos considerar uma sociedade socioeconómica destruturada (Marcelino 2012).

### 1.1.5. Perfil do Consumo Alimentar e Análise Nutricional Angolana

Uma das maiores preocupações do país é satisfazer as necessidades básicas da população e uma boa parte dos produtos de consumo em Angola são importados, isso indica que a produção de arroz, milho, feijão e açúcar, alimentos estes que fazem parte da cesta básica é insuficiente para suprir as necessidades da população. As cidades com maior consumo de produtos importados são Luanda, Benguela, Huambo e Huila e os produtos, mas importados são cereais e os seus derivados, leguminosas e carnes e seus derivados.

No campo nutricional os alimentos devem estar organizados por grupos que garantem ao consumidor uma alimentação equilibrada. De acordo com os estudos feitos, a tabela 5 ilustra numa visão analítica de um enquadramento por grupos de consumo alimentar junto com a descrição do alimento, tendo em conta os hábitos e costumes alimentares angolanos (FAO, 2013)

**Tabela 6:** Descrição dos alimentos com base nos grupos populacionais:

Grupo de consumo alimentar	Descrição dos alimentos de base consumo
<b>Muito pobre</b>	Cereais como único alimento de base Vegetais
<b>Pobre</b>	Cereais, outros alimentos ricos em açúcar, sais. Vegetais Ou tubérculos, sal, açúcar óleo vegetais e peixe Cereais açúcar, sal, vegetais e óleo.
<b>Moderadamente bom</b>	Cereais, leite, lácteos, açúcar, sais e óleo Cereais, peixe, óleo, açúcar, sal, e carne
<b>Bom</b>	Cereais açúcar, sal, vegetais feijão e óleo. Cereais, açúcar, sal, óleo, vegetais, tubérculos e carnes. Cereais, açúcar, sal, óleo, vegetais, peixe e outros

Fonte: FAO, 2005; ENSAN (gsa.@miniagro.gov.ao) 18 Ministério da Saúde. Inquérito Nacional de Nutrição, 200

Por outro lado observa-se que uma boa parte dos grupos de consumo alimentar bom e moderadamente bom são mas consumidos pela população de classe média e alta. Comparando com a população mais desfavorecida, verifica-se que este grupo apresenta uma nutrição pobre ou muito pobre. Isso implica que uma boa parte dos produtos alimentícios que constituem uma nutrição mais rica, nomeadamente os produtos cárneos são comercializados em cidades grandes e consequentemente mais desenvolvidas, como Luanda, Benguela, Huambo e Huila onde a importação desses produtos é elevada. Na figura 3 podemos observar a densidade demográfica de Angola das cidades com maior índice de importação (republica de angola, segurança alimentar e nutricional, 2009).

Fonte: “Segurança Alimentar E,” 2009.

Nutricional, 2009, apresentou-se um documento para discutir propostas relativas ao direito à alimentação e segurança alimentar, tendo surgido a Estratégia Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (ENSAN) que corresponde ao Plano de Ação (PASAN) onde o objetivo foi a recolha de comentários e sugestões de todos os sectores envolvidos na Promoção de Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) a fim de reduzir a miséria. Para este processo foi preciso o apoio técnico da FAO e outros apoios financeiros espanhóis de cooperação internacional (AECI). De modo geral estes apoios só irão contribuir para uma alimentação adequada e equilibrada da população. Por outro lado, para ter uma alimentação saudável deve ser levada em conta a aquisição destes alimentos para o consumidor. É facto que consumo de carne em Angola se tem generalizado: onde a procura é maior, a oferta também é maior em alimentos importados, despertando bastante interesse em analisar o consumo de produtos cárneos na sociedade angolana.

#### **1.1.6. Segurança alimentar e o consumo alimentar em produtos cárneos em Angola:**

Todo o ser humano tem direito a uma alimentação saudável que assegure uma qualidade de vida tão adequada quanto o possível. Este assunto reflete-se em todo o mundo e parte do pressuposto que as regras e as normas de segurança devem ser cumpridas. A segurança alimentar tem exercido um papel importante na alimentação da sociedade, sendo um componente primordial para uma dieta equilibrada e nutricional. Sabe-se que a carne é um alimento que constitui a fonte principal de proteínas. Produtos cárneos (à base de carne), são mais consumidos nos países de produção devido ao seu sabor apreciado (Rahmati *et al.*, 2016). Deste modo a autenticidade, rastreabilidade e a rotulagem nos produtos cárneos só irão certificar e garantir a segurança alimentar ao consumidor final.

Melhorando a rastreabilidade do produto haverá maior fidelidade na rotulagem do mesmo (Franco, 2014).

O recente escândalo de carnes contaminadas provenientes do Brasil e com destino a Angola foi publicada no Novo Jornal no dia 23 de março de 2017. Segundo o jornal, vinte e uma empresas estão supostamente envolvidas no processo de fraude de carne fresca (Novo jornal, 2017). Isso indica que muitas empresas de produtos alimentícios trabalham em prol do lucro e não pela qualidade do produto para o consumidor.

#### **1.1.7. A salsicha: Autenticidade e Rastreabilidade Rotulagem das salsichas em Portugal**

Os produtos embutidos (salsichas), conhecidas como carnes mecanicamente separadas (CMS), foram definidos como “todo produto elaborado com carne ou órgãos comestíveis, curado ou não, condimentado, cozido ou não, defumado e dessecado ou não, tendo como envoltório tripas, bexigas ou outras membranas animais” (Guerreiro. L, 2006). De acordo com a composição, as salsichas são feitas de carnes e vísceras comestíveis de diferentes espécies de animais. Entre as vísceras comestíveis, podem ser encontrados órgãos como estômago, coração, língua, rins, cérebro, fígado tendões pele e gordura (Zukál e Körmendy, 2007). Geralmente as salsichas são feitas através de uma mistura de ingredientes que são dissolvidos em água e ingredientes que se dissolvem em gordura a baixa temperatura. O resultado final da mistura é devida à extração das proteínas solúveis, tendo esta mistura um grande grau de viscosidade. Geralmente as salsichas acabam por ser processadas de forma alternativa devido às preferências de tingimento, depilação, defumação e utilização de recheios e alguns molhos (Guerreiro. L, 2006).

De acordo com a composição da matéria-prima e das técnicas de fabricação, as salsichas podem ser classificadas como salsicha tipo Viena, podendo ser de origem bovina ou suína,

tipo Frankfurt que contém algumas porções musculares de carne bovina ou suína e gordura e as salsichas de carne de aves mecanicamente separada. A classificação das salsichas é geralmente constante, podendo sofrer algumas alterações por adição de alguns ingredientes, por preferência do produtor. De modo a reduzir os custos, muitos fabricantes incorporam uma grande quantidade de restos provenientes do abate do animal, que à partida não são comestíveis, como ossos e tecido conjuntivo. É importante realçar que o tecido conjuntivo é rico em colagénio e contém uma fonte de hidroxiprolina que em muitos países da Europa é utilizado como indicador de qualidade dos embutidos (Guerreiro. L, 2006).

O processamento das salsichas pode ser esquematizado num fluxograma iniciado no preparo da carne e com fim no processo de estocagem, como é demonstrado na figura 4.

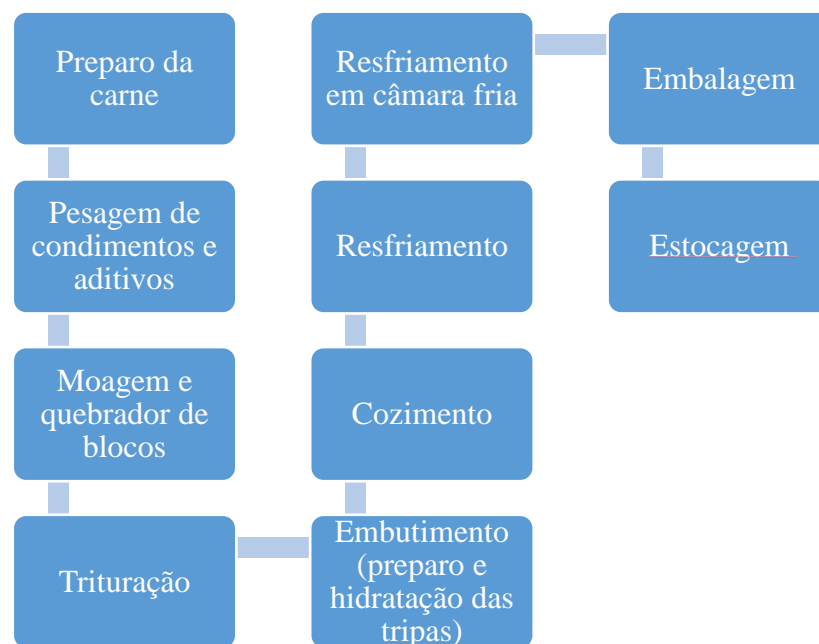


Figura 4: Fluxograma demonstrando o processamento das salsichas.

Segundo Guerreiro, 2006 durante a produção das salsichas existem etapas obrigatórias que possibilitam a produção de embutidos com garantia de qualidade: As carnes devem



estar congeladas ou resfriadas a uma temperatura entre -5°C e 2°C. A pesagem incorreta dos condimentos e dos aditivos influencia no seu estado de transformação representando um perigo de contaminação química (por exemplo contaminação com nitrito e nitrato). O processo de mistura é tradicionalmente utilizado para melhorar a homogeneização da fórmula e a moagem é importante na qualidade dos embutidos e linguiças, existindo testes de controlo de qualidade que se baseiam na avaliação do tamanho das partículas após a moagem. O embutimento é um processo em que podem ser utilizadas tripas naturais como do carneiro e tripas artificiais com um diâmetro de 22 mm. O processamento dos embutidos termina com o cozimento, resfriamento, depilação e tingimento (estes dois últimos são opcionais), o embalamento e rotulagem (Guerreiro. L, 2006)

A Lei nº15/03 de 22 de julho 2011, permitiu a criação de um sistema de proteção do consumidor onde descreve que a responsabilidade dos fornecedores é garantir ao consumidor confiança no seu produto (Diário da República, 2011).

No artigo nº1 descreve que “os locais de venda de carne e subprodutos devem satisfazer alguns requisitos de higiene. A aprovação das condições de higiene na distribuição e venda de carne e seus derivados em Portugal permite o controlo de qualidade dos produtos alimentícios que têm como destino final o consumidor. Para a venda em estabelecimentos comerciais, o decreto-lei nº147/2006 do Ministério da Agricultura do desenvolvimento rural e das pescas, afirma pelo artigo II que os locais de venda de carne e derivados devem possuir meios frigoríficos munidos de indicadores de temperatura fixados para a sua conservação (Decreto-lei nº147/2006). Este decreto aplica-se nas condições de higiene e técnica da venda de carne e subprodutos, onde referencia os requisitos gerais dos locais de venda, das instalações e do funcionamento dos locais de venda, bem como da preparação e venda de carne com o intuito de cumprir o regulamento que determina os

princípios e normas gerais da legislação alimentar para a segurança alimentar (Sentandreu e Sentandreu 2014) (decreto lei nº147/2006).

Em relação à carne picada, o decreto-lei nº147/2006 descreve que na “venda de carne e de produtos preparados é obrigatório conservar a uma temperatura referida” e serem vendidos no dia da sua preparação (decreto- lei n.º147/2006).

Existe por norma uma sala destinada para embalagem e rotulagem da carne fresca, picada e preparados de carne. O Rótulo deve seguir as instruções do decreto-lei nº147/2006 art. 15º, contendo os seguintes tópicos:

- a) Nome e morada do acondicionador;
- b) Denominação de venda (espécie);
- c) Data de acondicionamento;
- d) Data limite do consumo;
- e) Condições de conservação;
- f) Quantidade líquida.

Este decreto aplica-se nas condições de higiene e técnica da venda de carne e produtos onde referencia os requisitos gerais dos locais de venda, das instalações e do funcionamento dos locais de venda e da preparação e venda de carne e seus produtos, determinado os princípios e normas gerais da legislação alimentar (decreto lei nº147/2006).

## **1.2. Deteção de fraude alimentar em Portugal**

A persistência da fraude alimentar continua a ter um impacto negativo para o consumidor abalando a confiança do produto final. A lei europeia considera a fraude alimentar um

artefacto usado sem o consentimento oficial resultando em uma modificação de um determinado produto, com o intuito de obter lucro ilícito. Podem ser adicionadas substâncias que não se encontram no rótulo da embalagem (Vieira, A 2017).

#### **1.2.1. Estrutura, organização e funcionamento da ASAE**

O sistema de segurança alimentar portuguesa trabalha juntamente com um órgão que de uma forma geral controla a fraude em alimentos que é uma das preocupações primordiais das indústrias alimentares. A ASAE (Autoridade de Segurança Alimentar e Económica) é um órgão da polícia criminal responsável pela avaliação e comunicação dos riscos nas cadeias alimentares, tendo como objetivo a fiscalização e prevenção do cumprimento da lei sobre essas ações (ASAE, 2017).

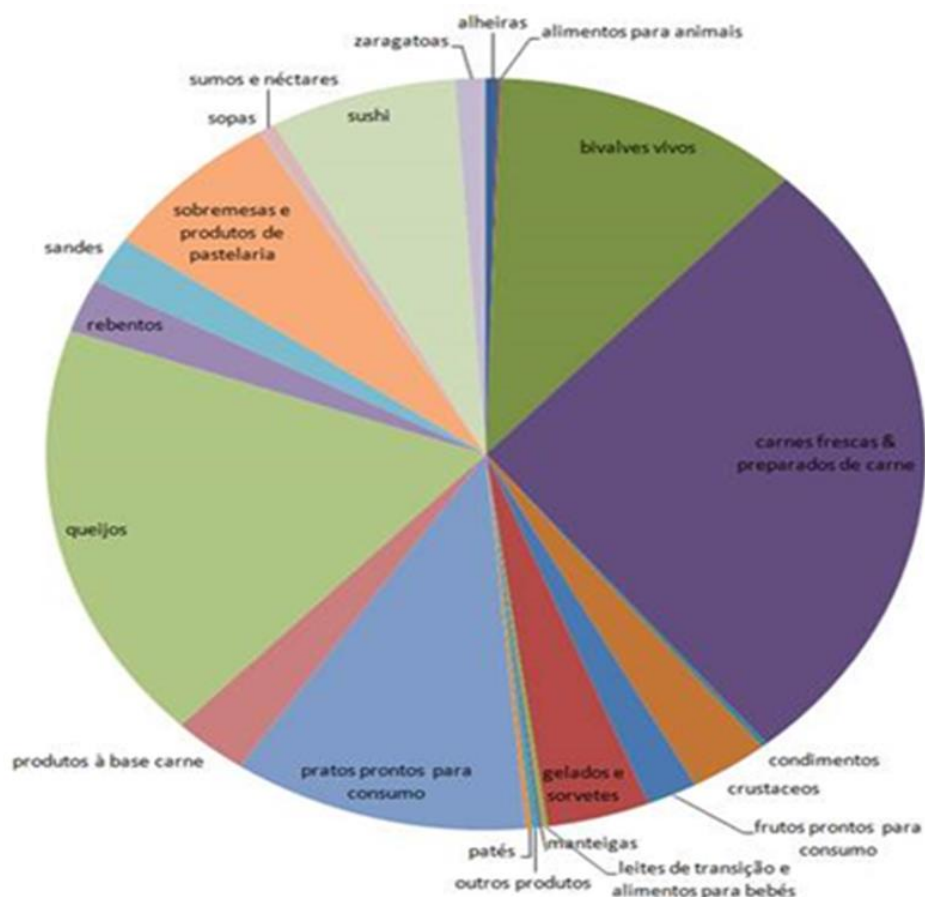
Por um lado, a ASAE trabalha em função de um organograma de forma a garantir maior um maior controlo na segurança alimentar. O sector de avaliação e comunicação de riscos alimentares faz uma avaliação da área técnica e científica e controla de segurança dos géneros alimentícios. Deste modo a ASAE desenvolveu um plano nacional de colheita de amostras (PNCA) que segundo a ASAE “tem como objetivo principal verificar se os géneros alimentícios colocados a disposição do consumidor são seguros no ponto de vista microscópico, químico e nutricional” a fim de garantir o bem-estar do cidadão (Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia 2002).

Nos laboratórios da ASAE são realizadas análises que permitem um rigoroso controlo de qualidade dos diversos vários postos de comércio de produtos alimentícios. O laboratório de segurança alimentar foi criado em 2006 e trabalha em parceria com o laboratório central de qualidade alimentar da DGFCQA que tem como finalidade transformar as políticas dos alimentos em um trabalho dinâmico, prospetivo e global para assegurar a saúde humana e do consumidor. Estes laboratórios estão devidamente separados,

existindo o laboratório de bebida e produtos vitícolas (LBPV), laboratório de físico química (LFQ) e o laboratório de microbiologia (LM). Dentre as atividades desenvolvidas pelo decreto-lei nº194/2012 de 23 de agosto, artigo nº1, o departamento de risco e elementos e laboratórios tem competência importante na avaliação do risco em alimentos para a saúde, o bem-estar animal e própria alimentação animal, permitindo a caracterização dos riscos em alimentos (Ministério da Economia e do Emprego 2012)

O Laboratório de Microbiologia (LM) tem como objetivo a realização de ensaios laboratoriais recorrendo-se de técnicas moleculares e microbiológicas com a finalidade a garantir a qualidade dos alimentos (ASAE, 2016).

Deste modo a ASAE proporciona a análise dos diversos géneros alimentícios, alimentos para animais e amostras ambientais, dentro dos parâmetros decretados por lei. A figura 5 diz respeito às amostras analisadas, por tipo de produto no Laboratório de Microbiologia em 2016, ano em que o setor mais analisado foram as carnes frescas e preparados de carnes (ASAE, 2016).



Fonte: [www.asae.pt](http://www.asae.pt) 2017 ASAE (autoridade e segurança alimentar e económica).

**Figura 5:** Amostras analisadas no LM (ASAE) por tipo de produto em 2016.

Por um lado, o laboratório da ASAE tem vindo a trabalhar de modo a que haja segurança alimentar garantida a todo o cliente. Segundo Pedro Portugal Gaspar, inspetor geral da ASAE, existem novas metodologias para a identificação de adulterações de produtos cárneos, nomeadamente contaminação com carne de cavalo e outros (Gaspar, P. 2015).

### **1.2.2. Casos de escândalos de fraude em produtos cárneos**

Ao longo do tempo, bastantes escândalos relacionados à indústria alimentar têm ocorrido, nomeadamente em produtos cárneos, tanto em carnes cruas como em carnes processadas. Daí têm resultado inúmeras queixas por parte dos consumidores, culminando em investigações por parte da ASAE. A análise molecular recorrendo às tecnologias mais recentes é indispensável na análise de fraudes alimentares (Amaral, Mafra e Oliveira, 2015). No caso das carnes, de modo a proceder a uma correta identificação de uma fraude com carnes estranhas, é imperativo utilizar marcadores moleculares bem conhecidos. Deste modo, o objetivo destes trabalhos é a identificação da espécie contaminante que substitui total ou parcialmente o produto (Riscos e Alimento, 2015a).

O resultado das análises feitas durante o caso das vacas loucas suscitou preocupação por parte dos consumidores relativamente à autenticidade dos produtos cárneos, devido aos recentes casos relacionados com a adulteração (Riscos e Alimento, 2015b).

O escândalo internacional que ocorreu entre 2012 e 2013 trouxe muita polémica que alarmou o consumidor; foram retirados do mercado produtos cárneos devido à adulteração com carne de cavalo (*Equus caballus*). Após os escândalos surgiram vários interesses em aplicar novas metodologias para a identificação de adulteração de produtos cárneos (Meira *et al.*, 2017a).

O instituto politécnico de Bragança, Portugal, realizou um trabalho em uma população muçulmana cujo objetivo foi avaliar a autenticidade de produtos cárneos em produtos Halal em lojas especializadas, onde foi detetada a presença de DNA de porco em produtos da Halal por PCR em tempo real. Entretanto, de acordo com os limites de quantificação, o resultado não apresenta um valor relevante para uma ação fraudulenta, mas demonstrou de facto uma possível contaminação (Amaral, Mafra, and Oliveira 2015).

Posteriormente, fez-se um estudo para avaliar a autenticidade de alheiras de caça, procedendo-se à identificação das espécies animais utilizadas, de uma população judaica transmontana (Trás-os-Montes, Portugal), em que o consumo de alheiras de caça se faz sentir. Nos últimos anos foram surgindo varias modificações na composição da alheira; entretanto passaram não só a ser produzidas alheiras com carne de caça, como também de aves, porco, entre outras. Tornou-se imperativo desenvolver metodologias para a identificação das diferentes espécies animais contidas naqueles produtos. Entretanto foram detetadas várias espécies, incluindo vaca, galinha, peru, lebre e porco. Consequentemente demonstrou-se a inconsistência com a rotulagem e ausência de carne de caça (Amaral, Mafra, and Oliveira 2015).

Isso demonstra que hoje em dia as pessoas estão propensas a ser mal informadas sobre a composição dos produtos que consomem, logo a autenticidade e a rastreabilidade dos produtos à base de carne são questões fundamentais que não devem ficar de parte na nossa sociedade (Sentandreu, 2014).

### **1.3. Métodos para a identificação de espécies em produtos cárneos**

Alguns trabalhos desenvolvidos nesta área têm, na sua maioria como prioridade o cuidado e a manutenção da qualidade dos materiais biológicos de modo a evitar contaminações e garantir a assepsia. De acordo com os protocolos estabelecidos, procede-se a rigorosas medidas de esterilização do material de uso geral como pontas de pipetas, placas de Petri, tubos, microtubos, câmaras de fluxo laminar, entre outros. São estabelecidas medidas preventivas, tais como o uso de luvas limpas a cada novo procedimento, preparação de soluções de forma a evitar contaminações e utilização de reagentes com elevado grau de pureza.

### 1.3.1. Amostras

As amostras biológicas são selecionadas e adquiridas na sua maioria em superfícies comerciais de uma determinada região ainda dentre as amostragens são selecionadas em função das espécies marca e o valor comercial. Podem também ser obtidas pelo cliente ou empresa cliente que se sinta insatisfeito com o produto e que alegue a ocorrência de fraude as espécies mas adquiridas para avaliar a robustez dos métodos e para avaliar a autenticidade dos produtos Bovino (*Bos taurus*), Peru (*Meleagris gallopavo*), Suíno (*Sus scrofa*), Veado (*Cervus elaphus*), Galinha (*Gallus gallus*), Pato (*Anas platyrhynchos*), Cabra (*Capra hircus*), Coelho (*Oryctolagus cuniculus*), Ovelha (*Ovis aries*) e Cavalo (*Equus caballus*) (Lopes. A, 2013).

### 1.3.2. Método baseado na análise de DNA

Uma das medidas mais importantes utilizadas nas análises de alimentos relaciona-se com a composição, estabilidade e a qualidade do produto. São utilizadas técnicas de Real Time PCR de modo a proceder à detecção de fraude em alimentos.

A identificação de espécies animal em produtos crus e processados como no caso das carnes moídas só veio ajudar na evolução das investigações de fraude, baseando-se nos métodos biomoleculares que têm a característica de ser sensíveis, rápidos e específicos de espécies para *Bos taurus*, *Ovis aries*, *Bubalus bubalis* e *Capra hircus* (Bottero e Dalmaso 2011). A reação em cadeia da polimerase (PCR) apresenta-se como uma metodologia rápida, sensível e muito específica. São realizados ensaios laboratoriais utilizando a Real Time PCR com SYBR Green para a detecção da qualidade de carne de porco e carne de aves em grande escala, especialmente devido aos escândalos de fraude nos géneros alimentícios relativamente à rotulagem e autenticidade do produto. Este



método revela alta especificidade através das análises da curva de fusão demonstradas nos produtos comerciais de carnes (Soares, Amaral, Oliveira, e Mafra, 2013).

Recentemente estudos revelaram fraude em carnes por análise de DNA no laboratório de microbiologia da autoridade e segurança alimentar económica (ASAE), tendo sido utilizados métodos de análise de modo a identificar as espécies contaminantes que se recorriam da análise de DNA (Amaral, Mafra, e Oliveira, 2015). A identificação de moléculas de DNA por PCR em tempo real é atualmente muito eficaz pois permite isolar e amplificar fragmentos de DNA característicos de diferentes espécies, como o cavalo, peru, galinha, vaca, ovelha cabra e pato ao mesmo tempo. Este é um método com uma elevada capacidade analítica (Amaral, Mafra e Oliveira, 2015).

**Tabela 7:** Resumo da literatura que se baseou na análise de DNA para a identificação da espécie *Equus caballus* após o escândalo internacional em 2013:

<b>Cavalo, burro, suíno</b>	Produtos cárneos crus e processados	pcr em tempo real	atpase 8/atpase6, nd2, nd5	0,1 pg de DNA 0,0001%	kesmen, z., <i>et al.</i> , (2009). Identification of meat species by taqman-based real-time pcr assay.
<b>Suíno, galinha, peru, bovino, cavalo, ovino, caprino</b>	Salsichas cruas e processadas	pcr em multiplex	Cytb-actin	2% para peru, ovino e caprino e 1% para os restantes	köppel, r., <i>et al.</i> , (2009). heptaplex realtime pcr for the identification and quantification of dna from beef, pork, chicken, turkey, horse meat, sheep (mutton) and goat. european food research and technology,
<b>Bovino, suíno, cavalo, e caprino</b>	Salsichas cruas e processadas	pcr em multiplex	β-actin	320 pg de DNA	köppel, r., et, al.,(2011). Multiplex real-time pcr for the detection and quantification of dna from beef, pork, horse and sheep. european food research and technology,
<b>Suíno, caprino galinha, avestruz cavalo, bovino</b>	Carnes comerciais e produtos cárneos	Deteção direta em multiplex	cytb,12s rARN, t-Glu-cytb, CO	12500 Cópias de mtDNA em suíno, caprino, galinha e bovino; 25,000 e 50,000 cópias de mtADN em cavalo e avestruz, respetivamente	Köppel, R., et, al., (2011). Multiplex real-time PCR for the detection and quantification of DNA from beef, pork, horse and sheep. European Food Research and Technology,
<b>Cavalo</b>	Produtos cárneos crus e processados	PCR com primers específicos e PCR em tempo real	cytb	1 pg e 10 pg para extractos de DNA crus e processados, respetivamente; 0,001% e 0,01% para misturas binárias cruas e processadas, respetivamente; 0,1 pg e 0,0001% para ambas as amostras	Meira, L. (2014). Desenvolvimento de metodologias de biologia molecular para a deteção de carne de cavalo ( <i>Equus caballus</i> ) em produtos cárneos. MSc Thesis, Pharmacy Faculty, Coimbra, Portugal.

FONTE:(Meira 2014)

Também são utilizadas técnicas de PCR com recorrência a *primers* específicos na análise de salsichas cruas, processadas e cozidas (Oliveira. T, 2010).

### 1.3.2.1. Extração de DNA

Diversos trabalhos científicos têm como objetivo principal avaliar a eficiência do método de extração de DNA utilizando várias técnicas diferentes. (Solléro *et al.*, 2004). As técnicas de extração de DNA de produtos cárneos mais utilizadas estão descritas na tabela 7.

Espécie alvo	Método de extração do DNA	Referência
Carne e salsichas	NucleoSpin® Food MACHEREY-NAGEL	(Manuela, S., <i>et al.</i> , 2015)
Porco, Peru	Wizard®	(Aung and Chang 2014)
Porco, vaca, ovelha	Fenol- clorofórmio	(Rafaela. F., 2015)
Carne crua e cozida	Método de Tris-EDTA	(Yalnkaya, Yumbul, Moziolu, & Akgoz, 2017)
Produtos a base de carnes	Método de CTAB	(Yalnkaya <i>et al.</i> , 2017)

FONTE: Autora

**Tabela 8:** Exemplos de diferentes métodos de extração do DNA utilizados em produtos cárneos (Burhanettin Yalçinkaya, 2016):

Convém utilizar a técnica que proporciona um maior rendimento e melhor grau de pureza na extração de DNA, uma vez que a quantidade de DNA pode ser escassa. Existem alguns kits de extração de DNA disponíveis no mercado que garantem um elevado rendimento e pureza da amostra, entre os quais o kit da Wizard, da Quiagen, da Zymogen e da GENESpin (Yalnkaya *et al.*, 2017).

### **1.3.2.2. Avaliação e quantificação do DNA:**

#### **Fluorimetria (Qubit™)**

Para quantificar e avaliar a pureza do DNA extraído por fluorimetria, utiliza-se o aparelho Qubit™ (Invitrogen) de fácil manuseio que permite fazer quantificação por fluorimetria a único analito (DNA, RNA e até mesmo proteínas.) dsDNA BR num intervalo de ensaio de 2-10,000µg de uma concentração de partida de uma amostra. Em um volume de ensaio baseado em 200µL (center for genomic sciences 2017). O valor obtido para cada amostra no aparelho de quantificação é multiplicado pelo fator de diluição utilizado de modo a ser obtida a concentração de DNA presente.

#### **Nanodrop™ 1000**

As amostras extraídas pelo método CTAB também podem ser avaliadas quanto à presença de impurezas e quantificadas por espectrofotometria, recorrendo ao aparelho Nanodrop™ 1000 (Thermo Scientific). Para fazer a quantificação e avaliar a pureza da amostra de ADN procede-se o nanodrop que vai permitir ler a absorvência máxima tanto para os ácidos nucleicos como para proteínas pelo comprimento de onda a 260nm em 280nm. A pureza da amostra de DNA selecionadas foram avaliadas entre a razão de (A260/A280) onde representativamente a resolução espectral indica  $\leq 1,8$  indicando um grão de pureza.

### **1.3.2.3. A técnica de PCR**

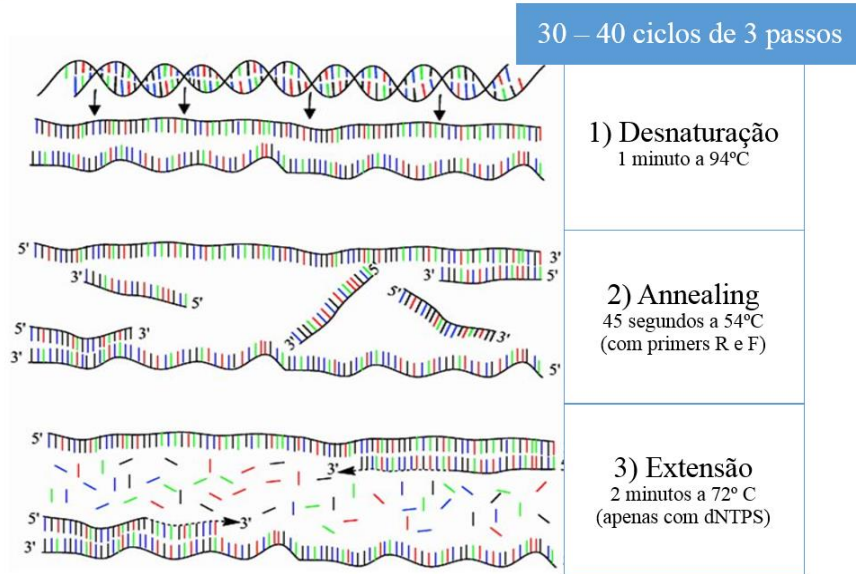
A técnica de PCR é realizada a partir de qualquer material biológico extraído de cada amostra, podendo ser aplicada em vários estudos tal como investigações forenses, saúde,

setor agropecuário, farmacêutica, entre outras áreas. Foi descrito por Kary B. Mullis em 1985 que ganhou o prêmio Nobel da Química (Vieira 1993)(Vieira 1993)Gandra e Gandra *et al.* 2008). Já estão disponíveis mais de 300 mil publicações científicas cujos autores se recorreram do elevado rigor, especificidade e versatilidade da PCR (Gandra *et al.* 2008). O objetivo da PCR é amplificar a amostra e isolar o local específico do DNA. Com o auxílio de *primers* específicos (oligonucleótidos), estes irão indicar o início de uma nova replicação.

Na técnica de PCR são utilizados *primers* específicos que se hibridam no DNA a amplificar, desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) e a enzima Taq DNA polimerase que polimeriza a cadeia molde do DNA, quando em cadeia simples. É utilizado um termociclador que possibilita as oscilações de temperatura que permitem a desnaturação, hibridação (*annealing*) dos *primers* e extensão da nova cadeia de DNA.

A PCR tem três etapas fundamentais com tempos e temperaturas variáveis, conforme pode ser observado na figura 7.

## PCR: Reação em cadeia da Polimerase



Fonte:

Figura 6: Representação esquemática das etapas da amplificação da PCR (Adaptado de Vierstraete, 1999).

A Desnaturação da dupla hélice ocorre a uma temperatura elevada (cerca de 95°C) (Oliveira. T, 2010). A etapa seguinte é conhecida como a Hibridação (*Annealing*). Nesta fase a temperatura baixa para uma temperatura que permita a hibridação dos *primers*. A temperatura de *Annealing* deve ser calculada tendo em conta a constituição dos *primers* (teor em purinas e pirimidinas). Nesta fase ocorre a hibridação dos *primers* nas cadeias complementares já desnaturadas através da formação de pontes de hidrogénio. A última fase é a Extensão e consiste no aumento da temperatura a 72°C. É aqui que a Taq DNA polimerase atua, permitindo a polimerização da segunda cadeia de DNA por adição de dNTPS (Meira *et al.*, 2017b), Estas três etapas repetem-se ao longo de cerca de 35 ciclos, conforme pode ser observado na figura 8.

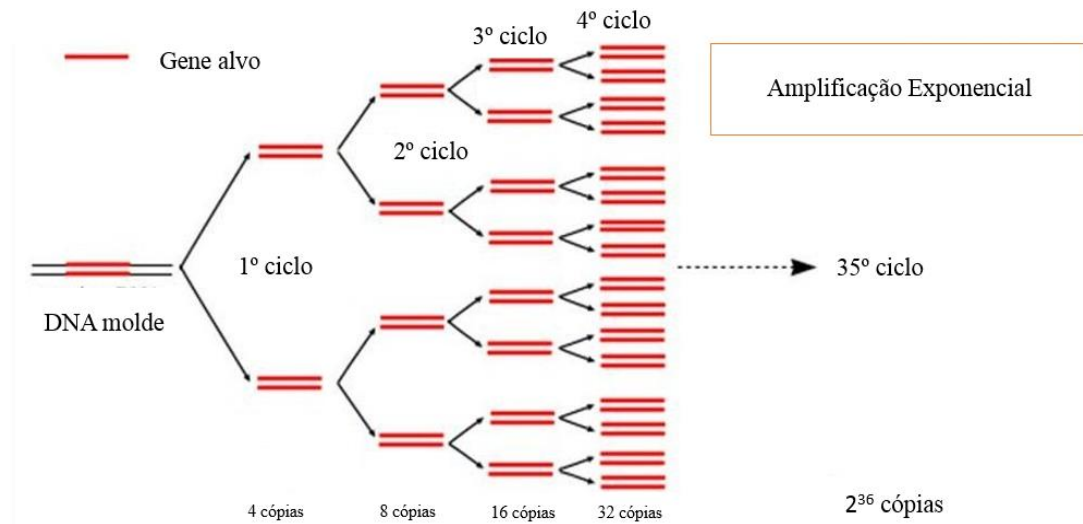


Figura 7: Representação da amplificação das cadeias de DNA na técnica de PCR. Para ter uma quantidade suficiente da sequência alvo são necessários cerca de 35 ciclos. Ocorre um aumento exponencial na quantidade de moléculas do DNA amplificado ( Felkl. G, 2014).

A técnica de PCR apresenta maior especificidade e sensibilidade comparando com outras técnicas, tornando-se muito comum em laboratórios de biologia molecular (Brugnamo 2010).

A PCR com *primers* específicos é utilizada para averiguar a autenticidade em alimentos. Esta técnica permite identificar fragmentos de DNA estranho em produtos cárneos e desse modo avaliar a sua pureza (Soares *et al.*, 2013). A escolha do tamanho do fragmento é importante pois existem amostras cujo DNA já está degradado. Por exemplo, Al-Kahtani e outros estudaram fragmento de DNA com 290 pb, em amostras de carne de porco (Al-Kahtani, Ismail e Asif Ahmed 2017).

#### 1.3.2.4. Multiplex PCR

A Multiplex PCR é uma técnica convencional da técnica de PCR que permite amplificar múltiplas sequências de DNA em simultâneo. São utilizados múltiplos pares de *primers* específicos ao longo da reação (Mou *et al.*, 2016). Esta técnica apresenta uma grande vantagem em estudos com o objetivo de identificar diferentes espécies a contaminar amostras de carnes cruas e processadas (Safdar e Abas, 2013). Por outro lado, uma das principais dificuldades é a diferença de tamanho dos fragmentos amplificados, sendo um fator a ter em conta na formação de produtos não específicos. Deste modo pode ser definida uma resolução entre 40-50 pb que permita a separação certa por eletroforese em gel de agarose.

Em suma, pode-se afirmar que esta técnica tem sido uma ferramenta bastante útil para a identificação de diferentes espécies em produtos cárneos, estando relacionada com investigação em alimentos (Brugnamo 2010). Segundo Morf (2013), com o desenvolvimento de metodologias biomoleculares para a deteção de produtos cárneos, a Multiplex PCR tem-se vindo a destacar não só na análise de DNA genómico como na análise de mtDNA (DNA mitocondrial) para a deteção de diferentes espécies (Morf *et al.*, 2013). De certo modo a PCR com *primers* específicos tem o mesmo princípio da técnica de Multiplex PCR, a diferença reside no simples facto de que na Multiplex PCR a amplificação é feita utilizando múltiplas sequências ao mesmo tempo pela presença de mais de um par de *primers* (Morf *et al.*, 2013).

### 1.3.2.5. PCR em tempo real

A PCR em tempo real foi descrita em 1993 por Higuchi e colaboradores, que conseguiram montar um sistema monitorizado durante os ciclos, permitindo detetar um aumento da fluorescência durante as reações através das ligações do brometo de etídeo às moléculas de DNA a serem amplificadas (Oliveira, 2010). A sigla qPCR/Real Time-qPCR é uma técnica de reação em cadeia da polimerase que permite seguir a amplificação das moléculas de DNA em tempo real, sendo também utilizados na análise de contaminação em produtos cárneos (Oliveira, 2010).

As amostras podem ser amplificadas recorrendo a diferentes kits, como o kit *SsoFast<sup>TM</sup> Eva Green*® (Bio-Rad Laboratories). Neste kit, Utiliza-se um volume final de 20 µL para cada amostra, conforme descrito na tabela 8.

Componente	Volume (µL)
<i>SsoFast EvaGreen Supermix 1X</i>	10
H <sub>2</sub> O	7,8
<i>Primer Forward</i>	0,6
<i>Primer Reverse</i>	0,6
DNA	1

FONTE: Autora

**Tabela 9:** componentes constituintes da reação de PCR em tempo real com *SsoFast<sup>TM</sup> Eva Green*® Supermix:

As amostras são amplificadas num aparelho como o *CFX96<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad), podendo ser utilizadas as condições descritas na tabela 9 (BIORAD, 2014).

T (°C)	Tempo	Ciclos
98	2 minutos	1
98	5 segundos	40
65	15 segundos	
95	1 minuto	
50	5 minutos	

Fonte: Autora

**Tabela 10:** Condições de amplificação para o *SsoFast EvaGreen*® Supermix



Segundo Cassidy (2017), a variação do ciclo de temperaturas no PCR em tempo real é crucial e, como tal, uma boa seleção de pares de *primers* está diretamente relacionada a essa variação. Todos os passos da PCR devem ser bem definidos. O ciclo a partir do qual a amplificação do DNA inicia é também importante, pois é este parâmetro que vai indicar se há carne contaminante e, no caso afirmativo, a sua quantidade relativa (Cassidy, MacLean e Gunson, 2017). Segundo Meira (2017), na execução da técnica de PCR em tempo real, podem ser utilizados corantes fluorescentes, entre os quais se destaca o corante SYBR®Green (um fluorocromo) que demonstra uma elevada sensibilidade e especificidade na detecção de mistura de carne de cavalo em carne bovina, permitindo deste modo detetar fraude em produtos cárneos processados. Durante o processo de PCR em tempo real, este corante fluorescente intercala-se na dupla cadeia de DNA, permitindo a detecção do produto de PCR durante a amplificação (Meira *et al.*, 2017a). Outras moléculas fluorescentes também têm vindo a ser utilizadas na técnica de PCR em tempo real, entre as quais a LCGreen® Plus (Idaho Technology) e EvaGreen® (Biotium Inc) (Oliveira, T, 2010).

A curva de *melting* é obtida fazendo aumentar a temperatura em 0,2 °C de 65 °C a 95 °C, logo após a amplificação em PCR em tempo real. Esta curva é obtida de modo a detetar a eventual presença de dímeros de *primers*. Assim será possível saber se apenas houve formação de produtos inespecíficos aquando da amplificação. Durante este aumento de temperatura, os dímeros de *primers* serão os primeiros a dissociar-se, se estiverem presentes, ficando esse fenómeno bem subjacente na curva obtida.

A figura 9 ilustra o ensaio da PCR em tempo real que foi determinado pelo uso de extrato de DNA de cavalo diluído em série para detecção de carnes processadas de diferentes

superfícies comerciais que foram analisadas depois dos escândalos de consumo de carne de cavalo em 2012, 2013 e 2014 (Meira *et al.*, 2017b).

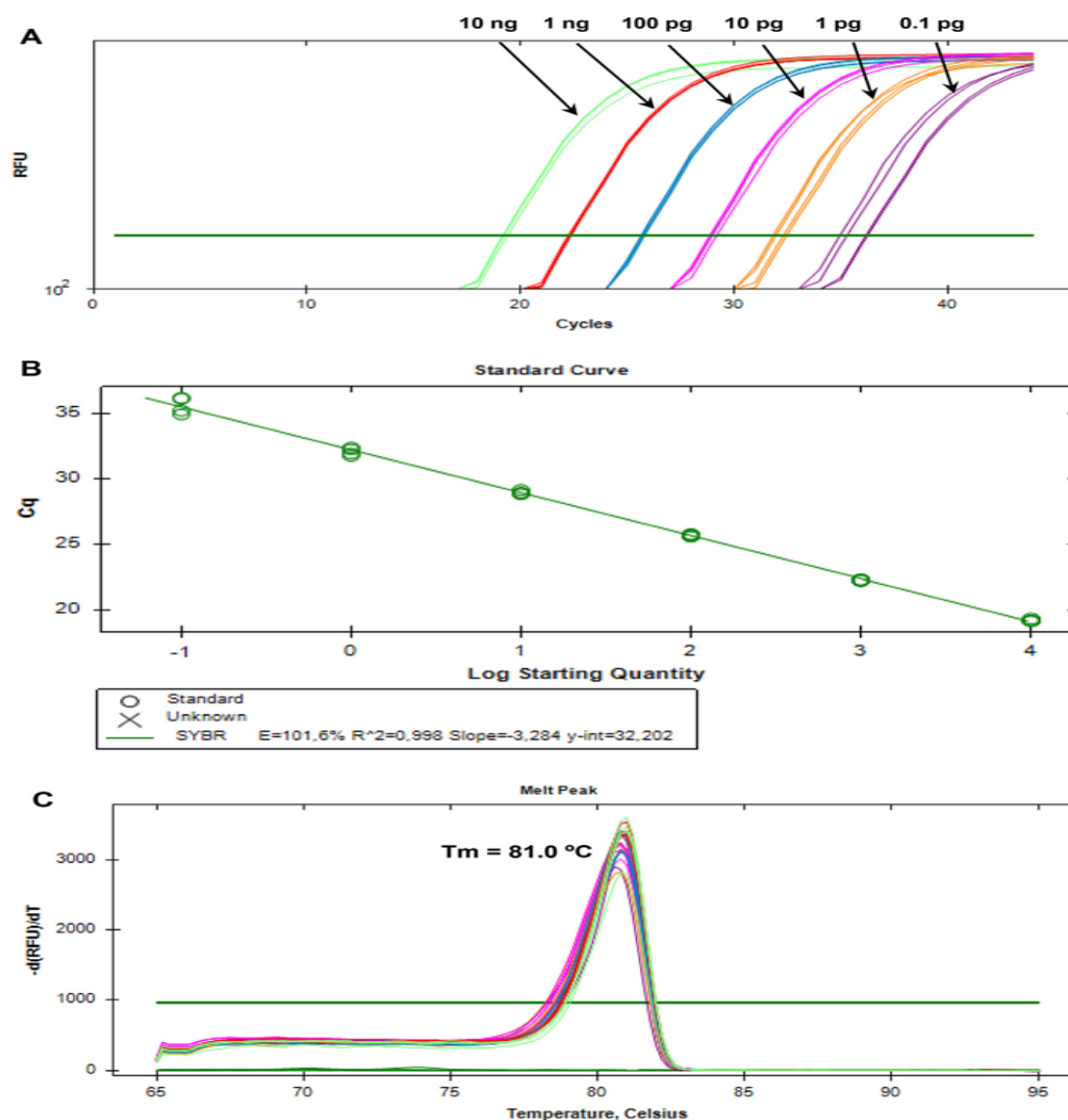


Figura 8: Descrição do método quantitativo da PCR em Tempo real para estimar a adulteração de carnes processadas com carne de cavalo. Foi utilizado o corante EvaGreen (Meira *et al.*, 2017a).

A PCR em tempo real demonstra maior especificidade em produtos cárneos tanto crus como processados em comparação ao método ELISA em carnes processadas (Perestam *et al.*, 2017). Deste modo, a PCR em tempo real apresenta maior concordância entre as amostras duplicadas ou referência (Perestam *et al.*, 2017).

Assim, a PCR em tempo real pode ser utilizada para detetar e quantificar o DNA de porco em carnes processadas e verificar se existem carnes contaminantes, como carne de cavalo e aves de capoeira (Soares *et al.*, 2013).

Segundo Mano (2017), foi desenvolvido um método de PCR em tempo real para quantificar o grau de fragmentação do DNA onde um índice de fragmentação de DNA foi criado para expressar o grau de fragmentação no DNA. Ficou demonstrada a eficácia do método no controle de qualidade na análise de alimentos (Mano *et al.*, 2017).

A tabela 10 demonstra vários ensaios utilizando a PCR em tempo real em produtos cárneos processados.

**Tabela 11:** Ensaios em que se utilizou da técnica de PCR em produtos cárneos processados

Título	Referência
EVAGreen PCR em tempo real para determinar a adulteração de carne de cavalo em alimentos processados.	(Meira <i>et al.</i> , 2017b)
Comparação de PCR em tempo real e métodos baseados em ELISA para a detecção de carne e carne de porco em produtos à base de carne processada.	(Perestam <i>et al.</i> , 2017)
Deteção de componentes murinos adulterados em produtos à base de carne por TaqMan © PCR em tempo real	(Fang e Zhang, 2016)
Deteção de porco em misturas de carne binária e alguns produtos alimentares comerciais utilizando técnicas de PCR convencionais e em tempo real.	(Al-Kahtani, Ismail e Asif Ahmed, 2017)
Deteção quantitativa de carne de porco pela EvaGreen PCR em tempo real para avaliar a autenticidade dos produtos de carne processados.	(Amaral <i>et al.</i> , 2017)

FONTE: Autora

Segundo Al-Kahtani (2017) a técnica de PCR em tempo real tem sido muito sensível comparativamente à PCR convencional na detecção de carne estranhas em carnes ditas de porco. Deste modo a PCR em tempo real tem vindo a ser uma ferramenta essencial contra os escândalos e comércio ilegal de carne (Al-Kahtani, 2017).

### **1.3.3. Método de ELISA**

O método ELISA (Enzyme LinKed Immunosorbent Assay) é uma técnica imunoenzimática que é utilizada como procedimento analítico baseando-se em uma reação específica entre o antígeno e o anticorpo correspondente (Lamas, 2011). De acordo com Bennetau, 2003 o método ELISA está a ser um método bastante utilizado em alimentos que contêm grande quantidade de fitoestrogénio, uma substância que pode ser facilmente falsificada, como no caso da soja (Bennetau-Pelissero *et al.*, 2003).

Este método tem sido bastante utilizado pois os resultados são reprodutíveis e a técnica não é assim tao dispendiosa. O método de ELISA é um método abrangente em investigação alimentar. Permite entre outros, detetar aflatoxinas, proteínas e outras moléculas. A identificação de carne contaminante através deste método tem sido vantajosa. Existem diversos tipos de ELISA, todos eles baseados no mesmo pressuposto da ligação antígeno-anticorpo, assim como kits comerciais rápidos para a identificação de espécies em produtos cárneos (Ecker *et al.*, 2013).

## 2. Objetivos

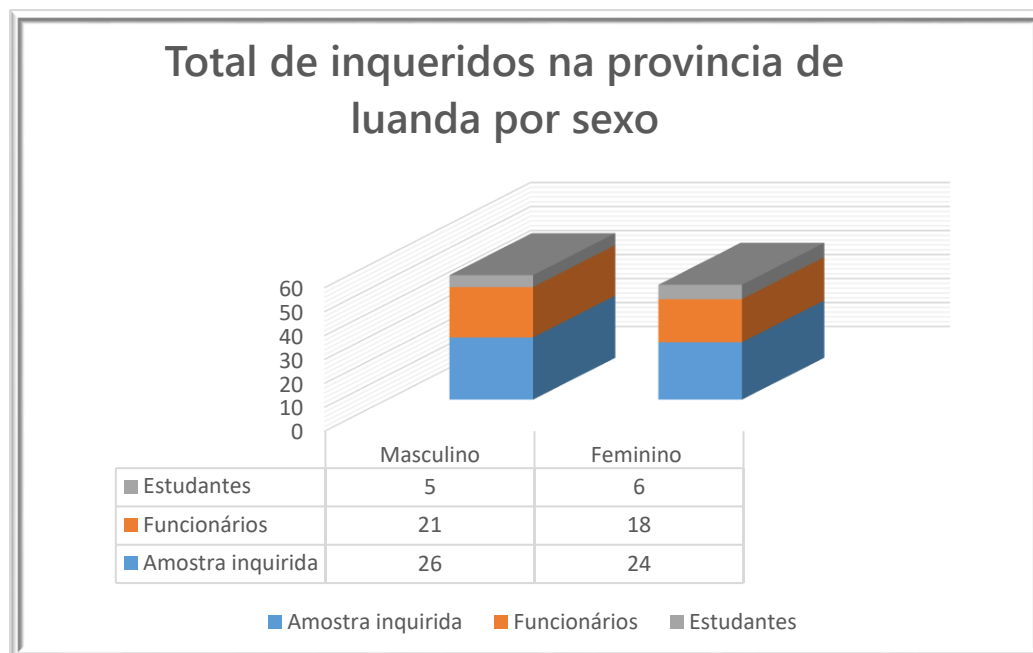
As salsichas são produtos cárneos que passam por um processo de transformação e, como tal, tem-se verificado a ocorrência de uma série de escândalos na comercialização destes produtos, tais como fraude por contaminação adulteração e falsificação. Por este motivo, é importante dar continuidade ao desenvolvimento das metodologias laboratoriais que permitam a deteção da presença de diferentes espécies contaminantes em carnes processadas, como é o caso das salsichas, de modo a aumentar a sua eficiência e reprodutibilidade. O desenvolvimento de novas técnicas laboratoriais a partir das existentes irá garantir uma maior credibilidade na venda do produto ao consumidor. Pretendendo-se igualmente mostrar um estudo de caso em Angola, relativamente ao consumo de salsichas.

Os objetivos deste trabalho circunscreveram-se nos seguintes: (i) Testar a aplicação da técnica de PCR em tempo real com a utilização de biomarcadores na análise de salsichas e avaliar o seu contributo no controlo da segurança alimentar, (ii) Identificar as diferentes marcas de salsichas mais consumidas pelas diferentes franjas da cidade de Luanda, mediante a aplicação de um inquérito a 50 participantes e (iii) Analisar os dados obtidos pela empresa controlvert relativamente a deteção de diferentes espécies nas salsichas frescas e conservadas, com a utilização da técnica de PCR em tempo Real.

### **3. análise do índice ao consumo de salsichas em Luanda**

Assim como outros produtos de origem animal, também as salsichas frescas e processadas são consumidas em Angola. As práticas comerciais destes produtos, os serviços prestados e as publicidades não são suficientemente precisas para garantir uma aceitação ao consumidor. Seria pertinente conhecer como estes produtos são produzidos e como e onde são comercializados. Deste modo com base nos objetivos do estudo foi feito um estudo para análise da viabilidade do consumo de salsichas frescas e conservadas e a sua implicância na sociedade. Foi elaborado um Inquérito com o objetivo de identificar as diferentes marcas de salsichas mais consumidas pelas diferentes franjas da cidade de Luanda, mediante a aplicação de um inquérito a 50 participantes.

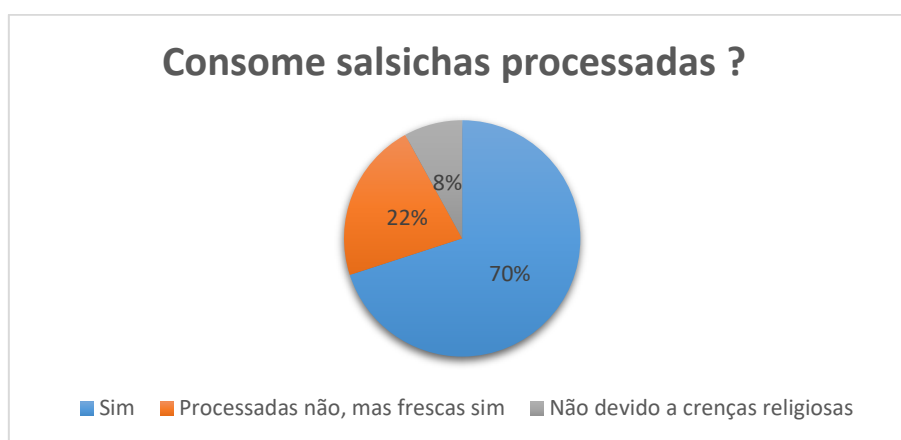
Dada a amostragem em estudo na comunidade angolana do município de Luanda, verificou-se que dos 50 inquiridos, 26 pessoas eram do sexo masculino e 24 do sexo feminino. Dentre os elementos do sexo masculino, foram ainda inquiridos 6 estudantes e 21 funcionários. Do sexo feminino, foram inquiridos 5 estudantes e 18 funcionários como evidencia a figura 10.



Fonte: Autora

Figura 9: Elementos que constituem as pessoas inquiridas em Angola na cidade de Luanda (município de Luanda).

Dada a amostragem em estudo na comunidade angolana do município de Luanda, verificou-se que dos 50 inquiridos, 26 pessoas eram do sexo masculino e 24 do sexo feminino. Dentre os elementos do sexo masculino, foram ainda inquiridos 6 estudantes e 21 funcionários. Do sexo feminino, foram inquiridos 5 estudantes e 18 funcionários como evidencia a figura 10.

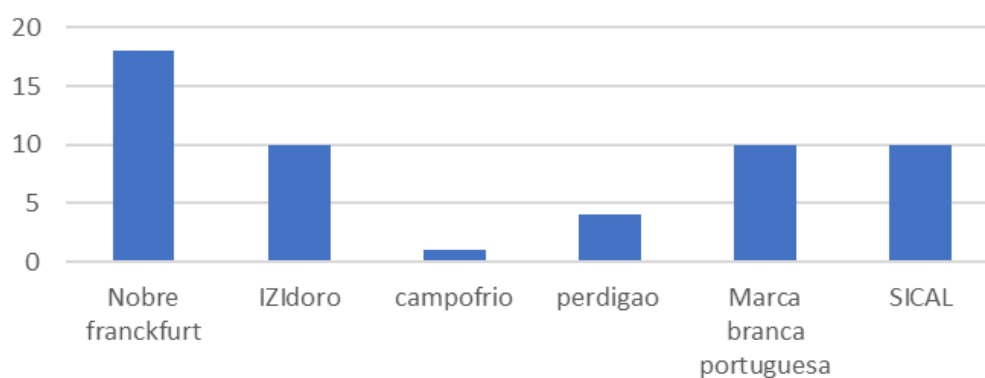


FONTE: Autora

Figura 10: Resposta dos inquiridos à questão “Consome salsichas processadas?”.

Verifica-se que 70% das pessoas inquiridas mencionaram que consomem salsichas processadas e 22% que não consomem salsichas processadas, mas consomem salsichas frescas do talho. Verifica-se ainda que 8% dos inquiridos não consomem destes produtos devido a motivação de cariz religioso.

Segundo este estudo, existe uma grande frequência de indivíduos em Luanda, Angola que consomem carnes processadas na forma de salsicha. Este produto alimentício tem sido consumido nestes últimos anos talvez pelo fácil acesso, estilo de vida, publicidade e baixo preço de mercado. No que concerne a marcas de salsichas em Angola, pressupõe-se que este maior consumo se deva às entidades fiscalizadoras e os fornecedores assegurarem a confiança destes produtos ao cliente. Neste caso a qualidade do produto refere-se aos produtos importados na sua maioria, como as marcas portuguesas. A figura 12 demonstra as marcas de produtos cárneos processados mais adquiridos em superfícies comerciais na cidade de Luanda.



Fonte: Autora

Figura 11: Marcas de produtos cárneos processados mais adquiridos.

Observa-se que a marcas Nobre Frankfurt é a mais procurada em superfícies comerciais devido à sua distribuição comercial em vários postos comerciais. A marca Izidoro, SICAL



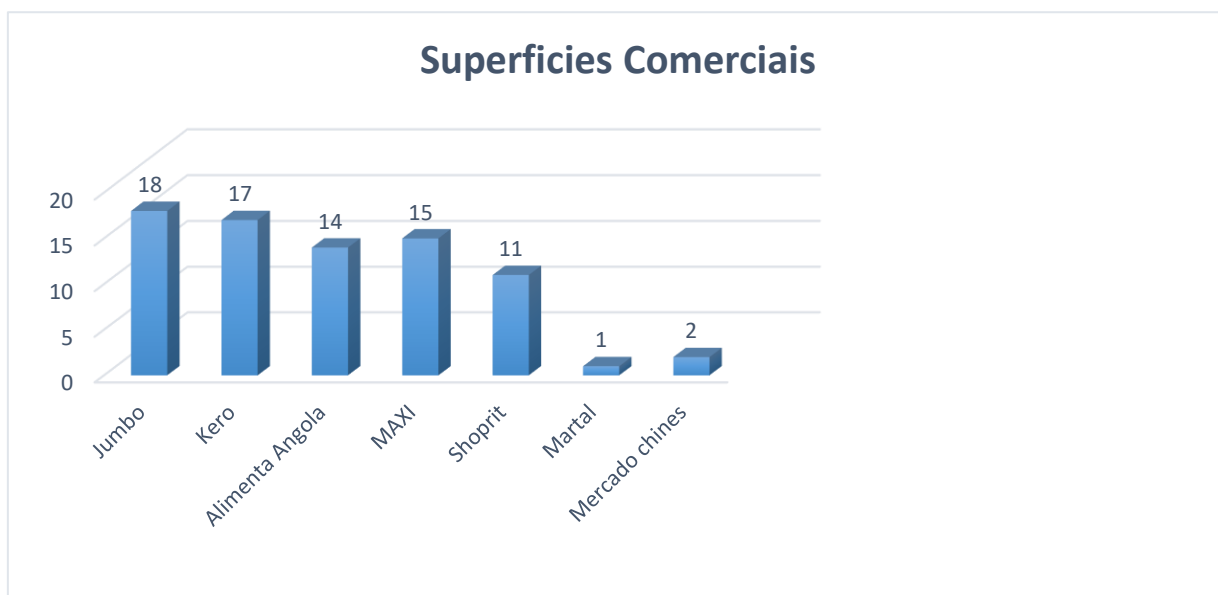
e as marcas brancas portuguesas (Continente, Dia%, Polegar, e Pingo Doce) têm tido uma procura bem acentuada. As marcas Campofrio e Perdigão, talvez pelo seu preço de importação, são menos acessíveis economicamente, logo são menos compradas, isto de acordo com a disponibilidade e a oferta do comerciante. O sistema de segurança alimentar entra em conformidade com os fornecedores e entidades fiscalizadoras a fim de garantir estabilidade económica para satisfazer as necessidades da população.



**Fonte:** Autora

**Figura 12:** Marcas seleccionadas com base no questionário utilizado para o estudo de análise do consumo de salsichas.

A figura 14 esmiúça as superfícies comerciais em Luanda, Angola, onde ocorre a aquisição destes produtos cárneos (salsichas). O Jumbo demonstra maior procura por ser um dos primeiros Hipermercados e pela sua localização central na cidade de Luanda.



**Fonte:** Autora

Figura 13: principais superfícies comerciais onde os inquiridos preferem proceder à aquisição de salsichas.

#### **4. Discussão dos Resultados obtidos pela ControlVet**

A fraude relativamente a enchidos e produtos cárneos processados tem ocorrido com uma maior frequência nos últimos anos. Esta adulteração resulta da substituição, falsificação e até da alteração do produto cárneo, ocorrendo uma evasão à devida descrição do produto. Subentende-se que a salsicha é um produto cárneo processado que contém propriedades de carnes frescas que foram modificadas através de tratamentos, biológicos, mecânicos e químicos, envolvendo a adição de outros componentes ( Ferraccioli, V. 2012) .

De acordo com o regulamento instituído por lei, é considerado fraude toda e qualquer ação que se caracterize em adicionar, retirar ou substituir um determinado componente de qualquer produto. Deste modo, qualquer componente que esteja presente no produto final, mas não seja mencionado no rótulo ou embalagem, não está de acordo com a lei. Todo o processo que leva à ocorrência de fraude alimentar, incluindo o abate do animal, o processamento da carne, a adição de certos aditivos alimentares, empacotamento e transporte põem em risco a saúde pública: É criada uma barreira entre o controlo de qualidade do produto e a segurança alimentar. Deste modo a indústria alimentícia deve seguir os padrões estipulados por lei, a fim de garantir um produto fiável e com menor risco possível para o consumidor.

De acordo com os objetivos traçados, e segundo a literatura, os problemas de autenticação e rotulagem alimentar podem ser alvo de processo de investigação. Como já foi referido anteriormente, o desenvolvimento de técnicas de despistagem ao nível molecular tem sido uma mais-valia em muitos laboratórios encarregues desta tarefa e, como tal, possibilitam a manutenção da qualidade alimentar dos produtos, nomeadamente as carnes processadas, que chegam à mesa dos destinatários. Salienta-se a técnica de PCR em tempo real e Multiplex PCR, que têm demonstrado uma elevada precisão na deteção de espécies

estranhas em produtos cárneos uma vez que se recorre de *primers* específicos para proceder à localização e isolamento de determinados segmentos de DNA (Meira *et al.*, 2017a).

O objetivo deste trabalho é testar aplicação de técnicas biomoleculares na análise de salsichas, como contribuir no controlo da segurança alimentar em Angola isso a partir de uma realidade portuguesa. foi realizado um estudo de casos observacional e descritivo com uma abordagem qualitativa e quantitativa das amostras utilizadas para a identificação das espécies contaminantes pela empresa ControlVet em Tondela, Portugal, desde 2015 até junho de 2017.

A ControlVet é uma empresa que presta serviço na área da segurança alimentar. É constituída por uma equipa de colaboradores de diversos países como Moçambique, Portugal, Cabo Verde, Espanha e outros. O principal objetivo da ControlVet é a prestação de serviços na área do controlo alimentar em vários níveis, como o nível biológico, químico, microbiológico e imunológico. Com a expansão dos sectores da ControlVet, a empresa tem assegurado a segurança alimentar dos diversos produtos alimentícios. Tem sido identificada a autenticidade das espécies em organismos geneticamente modificadas com recurso às análises por PCR em tempo real.

Relativamente à amostragem do presente trabalho, foram utilizados dados de amostras analisadas na ControlVet, nomeadamente carne de origem suína para despistagem de eventual presença de carne de bovino, galinha e cavalo entre 2015 e junho de 2017.

#### **4.1. Caraterização das amostras e do processo experimental:**

As amostras foram obtidas através de denúncias feitas por clientes ou pela empresa cliente. Estas amostras caracterizam-se por serem produtos cárneos (salsichas) em que há suspeita de contaminação com outras carnes. As mesmas foram submetidas a um processo de identificação de fraude, tendo sido analisada a possível contaminação com carnes de diferentes origens. As amostras passaram por uma fase de registo e conservação a uma temperatura não superior a -20°C.

##### **4.1.1. Extração de DNA:**

Foi feita uma extração de DNA de cada amostra, recorrendo a reagentes e kits comerciais de que a empresa ControlVet se dispõe. Na tabela 11 podemos verificar alguns dos kits que são utilizados em trabalhos corriqueiros pela ControlVet.

**Tabela 12:** Kits de extração de DNA utilizados pela ControlVet:

<b>Kits comerciais</b>	<b>Produção</b>	<b>Reference</b>
Kit NucleoSpin® Food	Macherey-Nagel, Alemanha	(Food e Ag, 2017)
Kit NucleoSpin® Tissue	Macherey-Nagel, Alemanha	(Tissue, 2017)
Kit SureFood® ANIMAL ID Pork Sens PLUS V	R-Biopharm, Alemanha	(Ag, Ag, e Products, 2011)

A extração do DNA das amostras de produtos cárneos foi executada recorrendo aos kits NucleoSpin® Food, útil para alimentos processados, e NucleoSpin® Tissue, utilizado em amostras de tecidos cárneos de acordo com as instruções de cada kit. Estes kits de extração de DNA garantem um elevado grau de pureza e rendimento das amostras.

#### **4.1.2. PCR em tempo real**

A técnica de PCR em tempo real é informativa pois permite controlar os ciclos de amplificação. A PCR em tempo real tem vindo a ganhar espaço nos laboratórios de biologia molecular por apresentar boa capacidade de obter resultados quantitativos e em tempo real. A ControlVet não se apresenta como exceção relativamente ao uso desta técnica. A elevada sensibilidade e especificidade desta técnica são parâmetros promissores nos trabalhos rotineiros desta empresa.

Uma vez que os parâmetros utilizados na técnica de PCR em tempo real pela ControlVet não foram disponibilizados, nomeadamente o corante utilizado, concentrações dos reagentes e ciclos de temperatura, os mesmos não serão apresentados.

#### **4.2. Resultados obtidos pela ControlVet e discussão**

Durante a realização deste trabalho fez-se uma análise dos resultados obtidos na ControlVet ALS, onde foram analisados mais de mil produtos alimentícios, desde o alimento cru até ao alimento processado. O estudo está direccionado para os surtos de fraude em produtos cárneos (Seabra, 2012). Foram seleccionadas 46 amostras de produtos cárneos que pudessem putativamente possuir 4 origens animais diferentes, analisadas pela ControlVet entre 2015 e 2017 e foram organizadas tabelas relativamente à presença de carne de bovino (tabela 12), de cavalo (tabela 13), de suíno (tabela 14) e de galinha (tabela 15). Foi utilizada a técnica de PCR em tempo real com recurso a *primers* específicos de cada espécie mencionada para proceder à avaliação de possível fraude alimentar.

Apenas as Salsichas de Bovino (com os números de análise 2920 e 3000) e de Novilho (2387) contêm de facto carne de origem bovina (*Bos taurus*), como seria de esperar e

como se pode observar na tabela 12. De todas as amostras, estas são as únicas que certificam a existência da mesma na sua embalagem.

**Tabela 13:** Dados reportados baseando-se na análise de DNA para a deteção de espécie bovina (*Bos taurus*) nas salsichas:

Ensaio	Data da Recepção	Produto	Nº de Análise	Resultado
Pesquisa de DNA de Bovino - Real time PCR	2017	6Folhadosdesalsicha"DIA"	282	Não detectado
		Salsichadeaves	523	Não detectado
		SALSICHASDEBOVINO'	3000	Detectado
		SalsichaBrasileira	3412	Não detectado
	2016	Salsicha Criolo c/picante	2689	Não Detectado
		SALSICHAS DE BOVINO '	2920	Detectado
	2015	SALSICHAS NOVIHO :KG	2387	Detectado

Fonte: ControlVet ALS, 2017

Das amostras analisadas pela técnica de PCR em tempo real para a deteção da espécie *Equus caballus* nos diversos produtos cárneos, verifica-se na tabela 13 que não houve fraude alimentar uma vez que nenhum dos produtos listados menciona a presença de carne de cavalo.

**Tabela 14:** Dados reportados baseando-se na análise de DNA para a deteção da espécie Cavalo (*Equus caballus*) nas salsichas:

Ensaio	Data da Recepção	Produto	Nº de Análise	Resultado
Pesquisa de DNA de Cavalo - Real time PCR	2017	6Folhadosdesalsicha"DIA"	282	Não detectado
		Salsicha Brasileira	3412	Não detectado
		SalsichaBrasileira	3799	Não detectado
	2016	8 Salsichas tipo Frankfurt	615	Não detectado
		Salsichas Bockwurst SK1	551	Não detectado
		Salsichas Bockwurst SK2	616	Não detectado
		Salsichas Bockwurst SK1	942	Não detectado
		8 Salsichas tipo Frankfurt'	2597	Não detectado
		Salsichas Bockwurst SK1'	2598	Não detectado
		Salsichas Bockwurst SK1'	2599	Não detectado
		Salsichas Bockwurst SK2 '	2600	Não detectado
		Salsicha de aves	3683	Não detectado
	2015	Ensaio Salsicha de Soja	6449	Não detectado

Fonte: ControlVet ALS, 2017

Das amostras analisadas pela técnica de PCR em tempo real para a deteção *Sus scrofa*, verifica-se que a sua presença não foi detetada apenas em salsichas cuja embalagem nãoa

mencionava, isto é, nos produtos de número de análise 523, 3799, 2175 e 2387. Podemos concluir que os produtos listados na tabela 14 não são alvo de corrupção alimentar.

**Tabela 15:** Dados reportados baseando-se na análise de DNA para a detecção de espécie de suíno (*Sus scrofa*) nas salsichas de porco:

Ensaio	Data da Recepção	Produto	Nº de Análise	Resultado
Pesquisa de DNA de Suíno - Real time PCR	2017	6 Folhados de salsicha "DIA"	282	Detectado
		Salsicha de aves	523	Não detectado
		Salsicha Brasileira	3799	Não detectado
	2016	8 Salsichas tipo Frankfurt	615	Detectado
		Salsichas Bockwurst SK1	551	Detectado
		Salsichas Bockwurst SK2	616	Detectado
		Salsichas Bockwurst SK1	942	Detectado
		8 Folhados de salsicha Dia %	2175	Não detectado
		Folhados de salsicha Dia 380G	2522	Detectado
		8 Salsichas tipo Frankfurt'	2597	Detectado
		Salsichas Bockwurst SK1'	2598	Detectado
		Salsichas Bockwurst SK2 '	2600	Detectado
		Salsicha Criolo c/picante	2689	Detectado
	2015	SALSICHA FRESCA :600 G	784	Detectado
		SALSICHAS NOVILHO :KG	2387	Não detectado

Fonte: ControlVet ALS, 2017

Das amostras analisadas pela técnica de PCR em tempo real para a detecção da espécie *Gallus galus*, verifica-se a sua ausência apenas em produtos que não mencionam a sua presença na embalagem, isto é, nos produtos cujos números de análise são 282, 6449 e 10398. As carnes de aves são mais dificilmente falsificadas uma vez que apresentam paladar, textura, cor, teor em gordura e outras caraterísticas diferenciadas. Estes resultados estão em conformidade com a rotulagem efetuada, conforme corrobora a tabela 15.

**Tabela 16:** Dados reportados baseando-se na análise de DNA para a detecção de espécie de galinha (*Gallus galus*) nas salsichas de ave:

Ensaio	Data da Recepção	Produto	Nº de Análise	Resultado
Pesquisa de DNA de Galinha - Real time PCR	2017	6 Folhados de salsicha "DIA"	282	Não detectado
		8 Salsichas tipo Frankfurt	615	Detectado
	2016	Salsichas Bockwurst SK2	616	Detectado
		Salsichas Bockwurst SK1	942	Detectado
		8 Folhados de salsicha Dia %	2175	Detectado
		8 Salsichas tipo Frankfurt'	2597	Detectado
		Salsichas Bockwurst SK1'	2599	Detectado
		Salsichas Bockwurst SK2 '	2600	Detectado
		Salsicha Criolo c/picante	2689	Detectado
	2015	Ensaio Salsicha de Soja	6449	Não detectado
		Salsicha Vital	10398	Não detectado

Fonte: ControlVet ALS, 2017



A detecção de diferentes espécies nestes produtos por PCR em tempo real implicaria a ocorrência de fraude. Isso leva-nos a concluir que de acordo com as tabelas, não houve contaminação com carnes estranhas, pelo que podemos averiguar que, nesse aspeto, a segurança alimentar está patente. Deve-se ter em conta que a segurança alimentar não é apenas assegurada pela contaminação com carnes de diferentes origens, mas também se baseia na presença de aditivos alimentares, formas de processamento, materiais utilizados na manufatura do produto, entre outros. Por exemplo, a adição de aditivos ou outros produtos pode trazer doenças como a anemia aplásica.

Outros testes de controlo de qualidade devem também ser realizados. Além da análise molecular, ao nível do DNA, seria importante proceder a uma análise ao nível da proteína, recorrendo a técnicas como Western blot, ELISA ou Imuno-precipitação. Deste modo as análises laboratoriais seriam muito mais informativas.

A presença de espécies não declaradas nestes produtos cárneos constitui fraude alimentar e os métodos de análise molecular, como a PCR em tempo real, têm-se revelado serem técnicas bastante eficientes relativamente ao controlo de qualidade destes alimentos e à manutenção da segurança alimentar.

## 5. Conclusão

Geralmente a estabilidade económica de um país economicamente condiciona a sua qualidade da segurança alimentar e nutricional. Os países como Angola padecem uma desorganização no sector económico que afeta varias áreas importante como a educação e a saúde prejudicando o bem-estar da população.

O perfil nutricional da população angolana demonstra uma diferenciação de níveis económicos e sociais, uma vez que há uma discrepância relativamente a distribuição dos bens alimentícios entre a população das zonas rurais das zonas urbanas, bem como na manutenção da qualidade dos mesmos.

O processo de importação para países em via de desenvolvimento tem dado oportunidade à corrupção e ocorrência de fraudes. Logo vai contribuir para a desorganização nos setores de controlo de qualidade e alimento.

A autenticidade e a rotulagem em produtos cárneos, nomeadamente a salsicha é importante para garantir a credibilidade e segurança por parte do consumidor. A ação fraudulenta nos produtos cárneos tem ocorrido com maior frequência nos últimos anos, desde a contaminação ate à adulteração dos produtos: na sua maioria são os produtos importados.

Os métodos de análise biomolecular, como a PCR em tempo real, bem como a utilização de *primers* específicos, conferem um alto valor para estudos moleculares nos ensaios em produtos cárneos processados que podem ser utilizados para a deteção e quantificação de diferentes espécies na carne. O método de extração tem influenciado muito para a exatidão da amostra do produto cárneo, conferindo uma credibilidade aceitável no produto final: quanto mais eficiente o método de extração, mais fiável o resultado derivado da análise molecular.

Dados como os apresentados pela ControlVet permitem mostrar ao cliente possíveis ocorrências de contaminação de espécies nas carnes disponíveis no mercado. os resultados obtidos desses alimentos crus e processados de 2015 e 2017 foram organizadas por tabelas mencionando à presença de carne de bovino (tabela 12), de suíno (tabela 14) e de galinha (tabela 15) entrando entra em conformidade com a rotulagem nas embalagens. O uso das técnicas de PCR nestas análises só tem demonstrado útil para a sociedade em geral;

Muitos estudos demostram resultados satisfatórios na deteção não propriamente fraudulenta por falsificação, mas por adulteração e alteração do produto. Deste modo quanto mais técnicas estiverem em desenvolvimento, a aplicação de novas metodologias irá contribuir diretamente para um autenticação e rotulagem satisfatória dos produtos cárneos, garantindo o bem-estar da população.

## 6. Referências Bibliográficas

**Al-Kahtani, Hassan A., Elsayed A. Ismail, and Mohammed Asif Ahmed.** 2017. "Pork Detection in Binary Meat Mixtures and Some Commercial Food Products Using Conventional and Real-Time PCR Techniques." *Food Chemistry* 219. Elsevier Ltd: 54–60. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.108.

**Al-Kahtani, Hassan A., Elsayed A. Ismail, and Mohammed Asif Ahmed.** 2017. "Pork Detection in Binary Meat Mixtures and Some Commercial Food Products Using Conventional and Real-Time PCR Techniques." *Food Chemistry* 219. Elsevier Ltd: 54–60. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.108

**Amaral, Joana S., Isabel Mafra, And M. Beatriz P. P. Oliveira.** 2015. "Riscos E Alimentos - Riscos E Benefícios Associados Ao Consumo De Carne De Caça." *Asae* 9: 17–19 A.

**Amaral, Joana S., Graciete Santos, M. Beatriz P P Oliveira, And Isabel Mafra.** 2017. "Quantitative Detection Of Pork Meat By Evagreen Real-Time Pcr To Assess Theauthenticity Of Processed Meat Products." *Food Control* 72. Elsevier Ltd: 53–61. Doi:10.1016/J.Foodcont.2016.07.029 B.

**ASAE,** (03 De Março 2016). Plano Nacional De Segurança Alimentar: Procedimentos De Atuação, Ref.<sup>a</sup> N.º I/1176/16.

**Estratégia Nacional De Segurança Alimentar E Nutricional.** (2009, Março) *Segurança Alimentar E Nutricional*, P 11-12.

**Coutinho Et. Al,** (2012) *Segurança Alimentar E Nutricional Na Comunidade Dos Países Da Língua Portuguesa: Desafio E Perspectivas.* World Nutrition Rio 2012, P 20-21.

**DIÁRIO, DA REPÚBLICA.** 2011. "Decreto-Lei N.º 36-A/2011, De 9 De Março," No. 2: 2–11. <https://dre.pt/Application/File/74608059>.

**Ecker, Christina, Anna Ertl, Walter Pulverer, Albert Nemes, Pal Szekely, Angelika Petrasch, Gertrud Linsberger-Martin, and Margit Cichna-Markl.** 2013. "Validation and Comparison of a Sandwich ELISA, Two Competitive ELISAs and a Real-Time PCR Method for the Detection of Lupine in Food." *Food Chemistry* 141 (1). Elsevier Ltd: 407–18. doi:10.1016/j.foodchem.2013.02.091.

**Factos Essenciais Sobre As Nações Unidas,** (Nova Iorque, 27 De Agosto 2013), Programa Das Nações Unidas Para O Desenvolvimento (Pnud) Copyright © 2014 P 34.

**FAO,** ( Março De 2013). Situação Da Governança Da Segurança Alimentar E Nutricional E Papel Da Agricultura Na Família Na Cplp, Projeto De Estudo Para Uso Interno. P 44.  
10. República De Angola, (2, Abril De 2009). *Segurança Alimentar E Nutricional. Versão Para Discussão Nº2 29-01-2009/13:03:16/Ensan\_Ana.Doc/Ppg.*

**FAO,**(2014)Introduction: Critical Perspectives On Food Sovereignty. *The Journal Of Peasant Studies*, Vol. 41, No. 6, 911–931, [Http://Dx.Doi.Org/10.1080/03066150.2014.963568](http://dx.doi.org/10.1080/03066150.2014.963568).

**Felkl, G.** (2014) Autenticidade Molecular de Produtos Carneos. *Universidade Tecnológica federal do Parana CDD(20.ed)* 670-42.

**Ferraccioli, V.** 2012. “Avaliação Da Qualidade De Salsichas Do Tipo Hot Dog Durante O Armazenamento. *São caetano do Sul*, SP CEUN-EEM, p117

**Gaspar, P.** (Junho De 2016). Riscos E Alimentos: Carne E Produtos Carneos, *Asae E A Efsa - Cooperação Com A Efsa Em 2015 – Nº9* Pág. 3

**Guerreiro, L.** (2006) Dossie Tecnico Produção De Salsichas: Produção De Salsichas *Redetec - Rede De Tecnologia Do Rio De Janeiro*, P 12.

**Lopes, A.** (2013). “Métodos De Biologia Molecular Aplicados À Segurança Alimentar E Sua Validação Identificação De Espécies De Bovino ( Bos Taurus ) E Métodos De Biologia Molecular Aplicados À Segurança Alimentar: Identificação De Espécies De Bovino ( Bos Taurus ) E Suíno, *Universidade De Coimbra*. P 33-48.

**Marcelino, H.** (2012). Segurança Alimentar E Nutricional Na Optica Do Acesso E Consumo: Estudo De Casos Em 12 Municípios De Angola. *Praceta Farinha Leitão*, 27-1º Dtº - C.P. 3788 Luanda – Angola

**Mano, unichi, Yasuyuki Nishitsuji, Yosuke Kikuchi, Shin-ichi Fukudome, Takuya Hayashida, Hiroyuki Kawakami, Youichi Kurimoto, et al.** 2017. “Quantification of DNA Fragmentation in Processed Foods Using Real-Time PCR.” *Food Chemistry* 226. Elsevier Ltd: 149–55. doi:10.1016/j.foodchem.2017.01.064.

**Meira, Liliana, Joana Costa, Caterina Villa, Fernando Ramos, M. Beatriz P.P.Oliveira, And Isabel Mafra.** 2017a. “Evagreen Real-Time Pcr To Determine Horse Meat Adulteration In Processed Foods.” *Lwt - Food Science And Technology* 75: 408–16. Doi:10.1016/J.Lwt.2016.08.061 A.

**Meira, Liliana.** 2014. “Desenvolvimento De Metodologias De Biologia Molecular Para A Detecção De Carne De Cavalo ( Equus Caballus ) Em Produtos Cárneos,” 75

**Morf, N. V., K. L. Wood, R. Köppel, N. Felderer, M. Daniels, B. Tenger, and A. Kratzer.** 2013. “A Multiplex PCR Method to Identify Bushmeat Species in Wildlife Forensics.” *Forensic Science International: Genetics Supplement Series* 4 (1): 202–3. doi:10.1016/j.fsigs.2013.10.104.

**Oliveira, T.** 2010. “Pcr Em Tempo Real: Métodos E Aplicações.” *Universidade De Aveiro*, 14–77. [Http://Hdl.Handle.Net/10773/7230](http://hdl.handle.net/10773/7230).

**Organização Das Nações Unidas Para A Alimentação E Agricultura.** (2014) *O Estado Da Insegurança Alimentar No Mundo*, P 1-4.

**Perestam, Adam T., Kayleigh K. Fujisaki, Omar Nava, and Rosalee S. Hellberg.** 2017. "Comparison of Real-Time PCR and ELISA-Based Methods for the Detection of Beef and Pork in Processed Meat Products." *Food Control* 71. Elsevier Ltd: 346–52. doi:10.1016/j.foodcont.2016.07.017.

**Rahmati, Shahrooz, Nurhidayatullaili Muhd Julkapli, Wageeh A. Yehye, And Wan Jeffrey Basirun.** 2016. "Identification Of Meat Origin In Food Products-A Review." *Food Control* 68. Elsevier Ltd: 379–90. Doi:10.1016/J.Foodcont.2016.04.013

**Regulamento** (Ue) N. O 1169/2011 Do Parlamento Europeu E Do Conselho. (25 De Outubro De 2011) Parlamento Europeu. Conselho Da União Europeia, P 19.

**Reissig. G, (2009)** Fraude Alimentar: Tipos E Deteção, *Universidade Federal De Pelotas*, P 12-26.

**Sentandreu, Miguel Ángel, And Enrique Sentandreu.** 2014. "Authenticity Of Meat Products: Tools Against Fraud." *Food Research International* 60. Elsevier Ltd: 19–29. Doi:10.1016/J.Foodres.2014.03.030.

**Soares, Sónia, Joana S. Amaral, M. Beatriz P P Oliveira, And Isabel Mafra.** 2013. "A Sybr Green Real-Time Pcr Assay To Detect And Quantify Pork Meat In Processed Poultry Meat Products." *Meat Science* 94 (1). Elsevier Ltd: 115–20. Doi:10.1016/J.Meatsci.2012.12.012.

**Solléro;Pena. B; Faria. D; Paiva. S; Guimarães. S; Lopes. P; And Paixão. D.** 2004. "Método Rápido De Extração De Dna Utilizando Ctab Em Tecidos." *Zootec*, 2–5.

**Vieira, A.** (2017) Fraude Alimentar, Uma Realidade Na Mira Dos Reguladores, *Food Fraud Network 2015*, P1.

**Yalcinkaya. B; Yumbul; Moziog. E,** 2017 Food Chemistry: Comparison Of Dna Extraction Methods For Meat Analysis, Elsevier 1253-1257.

**Yalnckaya, Burhanettin, Eylem Yumbul, Erkan Mozioglu, and Muslum Akgoz.** 2017. "Comparison of DNA Extraction Methods for Meat Analysis." *Food Chemistry* 221: 1253–57. doi:10.1016/j.foodchem.2016.11.032.

**Zukál, E., And L. Körmendy.** 2007. "On Calculation Of 'Meat Content' According To The Quantitative Ingredient Declarations (Quid)." *Journal Of Food Engineering* 78 (2): 614–21. Doi:10.1016/J.Jfoodeng.2005.10.033.

## **Anexos**

## Anexos-1 Inquérito

Análise da viabilidade do consumo de salsichas frescas e conservadas e a sua implicância na sociedade do consumo.

O trabalho tem como objetivos identificar a quantidade de salsichas consumidas as diferentes marcas de salsichas, conhecer a diferença do preço do produto em supermercados no Município de Luanda e Kilamba-Kiayi na Província de Luanda.

Publico em geral grupo alvo-100/ 50

Inquérito Idade 24

F

Nacionalidade Angolana

o Inglaterra

Actividade profissional F. Pública

ntrevista 27/6/2017

Sexo:

Município

Data da entrevista

1) Consome salsichas frescas e processadas?

Sim

Nao\_\_\_\_\_

2) Sobre a salsicha, qual dos produtos recai na sua preferência?

Salsichas frescas\_\_\_\_\_

Salsichas processadas\*\_\_\_\_

Salsichas embaladas\_\_\_\_\_

3) Relativamente a espécie de carne qual as salsichas que tem maior preferência?

Espécie de carne	
Salsichas de porco	
Salsichas de bovina	



Salsichas de frango	
Salsichas de aves	
Salsichas vegetarianas	

4) Qual é a marca que costuma adquirir? Marca com um X

Izidoro 1100%		Nobre Frankfurt	
Izidor cokitail		Nobre forno de lenha	
Hotdog auchan		Pingo doce Frankfurt	
Nobre hot dog		Dia% hot dog bock worst	
Nobre cokitail		Dia% cocktail	
Izidoro mas vida		Dia Frankfurt	
Nobre wienerw		Dulano Bockwurst	
Hochuald kiddis		Bocklunder hot dog	
Nobre hot dog		Polegar hot dog	
Nobre EDL H.D		Auchan hot dog	
Izidoro backwur		Continente Frankfurt	
Salsichas Chinesa		ppedidi	
Salsichas brasil		Halal oderic	

5) Quais os principais supermercados de aquisição das salsichas processadas

Supermercado kero	
Hipermercado Jumbo	
Supermercado Maxi	
Supermercado Shopriyte	
Supermercado Loja dos frescos	
Supermercado Martal	
Shoping kilamaba mercado chinês	

6) Relativamente ao preço do produto qual o critério de escolha?

A compra do produto é pela qualidade do produto	
A Compra do produto pelo valor, mas baixo	
A compra do produto pelo valor promocional da loja	

A compra do produto pelo preço alto	
-------------------------------------	--

7) Quais as quantidades de salsichas frescas e processadas consomem?

Dias	
Semana	
Anualmente	
2 Vezes or semana	
3 Vezes or semana	

8) Diga se tem o hábito de consumir salsichas frescas

Salsichas frescas do talho	
Salsichas frescas do supermercado	
Salsichas frescas embaladas	

9) Habitualmente tem feito as refeições em casa?

Sim X—

Não—

10) Tem informação sobre os riscos e benefícios em relação ao consumo de salsichas?

Sim

Não—

## Anexo-2 Ficha de estágio

### ANEXO FICHA DE ESTÁGIO

IDENTIFICAÇÃO	
Estudante	LUZIA GEORGETH PEREIRA DE SOUSA
Número Mecanográfico	75171
Curso	MESTRADO BIOLOGIA MOLECULAR E CELULAR
Data de início	28-06-2017
Data de conclusão	28-10- 2017
Local da formação	CONTRLOLVERT
Orientador da UA	PROFESSOR LUIS SOUTO MIRANDA
Orientador da EA	DANIELA DE SÁ PEREIRA E SILVA.

### Resumo do Plano de Estágio

*Em cumprimento do disposto no art.º 49.º n.º 5 do Regulamento de Estudos da Universidade de Aveiro*

Avaliação da viabilidade de uma Estratégia Biomolecular por  
Despistagem em Salasichas Frescas e Processadas

FASES DE TRABALHO/COMPONENTES DE AVALIAÇÃO	DESCRIÇÃO DAS FASES DE TRABALHO/ COMPONENTES DE AVALIAÇÃO
Objetivo	OBJETIVO A DETEÇÃO DE MISTURAS DE CARNE NAS SALSICHAS PROCESSADAS EM MARCAS COMERCIAIS 100% CARNE DE PORCO.
Desenvolvimento e Execução	RECOLHA DE DADOS SOBRE AS ATIVIDADES REALIZADAS PELA INSTITUIÇÃO NO ÂMBITO DA IDENTIFICAÇÃO DE POSSÍVEIS MISTURAS DE CARNES EM SALSICHAS DE PORCO
Relatório Final	A SER ELABORADO APOS AS ATIVIDADES

Anexo – 3 protocolo de estagio

# Dados a Incluir no Protocolo de Estágio

## Entidade de Acolhimento

Designação (completa)

ControlVet Segurança Alimentar SA

Morada (completa)

Zona Industrial de Tondela ZIM II Lote 6 3460-070 Tondela

Website (URL)

Nº de Contribuinte

504 313 290

Responsável

Nome (completo)

João Fernando Marques Rebelo  
Cotta

Cargo

Administrador

Grau  
Académico

Doutoramento

## Estágio

Título (completo)

Estratégias biomoleculares para identificação de diferentes  
espécies animais em salsichas frescas e conservadas

Data de Início

Julho

Data de  
Término

Outubro

Duração Total  
(de formação)

Duração  
(em contexto de  
trabalho  
efetivo)

## Orientadores

### Orientador Externo

Nome (completo)	Grau Académico
Daniela de Sá Pereira e Silva	Doutora

### Orientador Interno / Nome Completo

Luís Manuel Souto Miranda

## Aluno

### Nome (completo)

Luzia Georgeth Pereira de Sousa

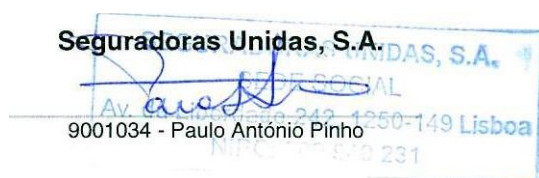
### Morada (completa)

Residência da universidade de Aveiro

Endereço de E-Mail	Nº Mecnográfico	Nº de Contribuinte
luziasousa@ua.pt	75171	242936776

Aveiro

27-06-17



Seguradoras Unidas, S.A.

sede: AV. da Liberdade, 242 -1250-149 Lisboa - Tel: 707 201 248 ou 217 984 000 - Fax: 213 554 021 - [www.acoreanaseguros.pt](http://www.acoreanaseguros.pt)